



**KİTOSAN KATKILI İLETKEN POLİMERLERİN
HAZIRLANMASI, ELEKTROKROMİK VE
BİYOSENSÖR UYGULAMALARI**

Betül ÇİÇEK ÖZKAN

DOKTORA TEZİ

Anabilim Dalı: Metalurji ve Malzeme Mühendisliği

Programı: Malzeme

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin TURHAN

İkinci Danışman: Prof. Dr. Metin AK

OCAK - 2018

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİTOSAN KATKILI İLETKEN POLİMERLERİN HAZIRLANMASI,
ELEKTROKROMİK VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI**

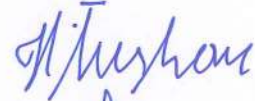
DOKTORA TEZİ

Betül ÇİÇEK ÖZKAN

(131130202)

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 05 ARALIK 2017
Tez Savunması Tarihi: 05 OCAK 2018**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hüseyin TURHAN



Tez İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Metin AK



Üye: Prof. Dr. Kadir DEMİRELLİ



Üye: Prof. Dr. Vedat SAVAŞ



Üye: Doç. Dr. Serkan ÖZEL



Üye: Doç. Dr. Hülya DEMİRÖREN



Üye: Yrd. Doç. Dr. Erdinç VURAL



Bu tez çalışması Fırat üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü tarafından FÜBAP TEKF.17.18 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu belge ile bu tezdeki bütün bilgilerin etik ve akademik kuralara uygun olarak elde edilip, sunulduğunu; bu tezde yapılmayan ancak ihtiyaç duyulan tüm bilimsel verilerin, bulguların, araştırmaların ve materyallerin bilimsel etik şartlarına ve kurallarına uygun olarak alıntı yapılan eserlere veya çalışmalara atıf yapıldığını ve kaynak gösterildiğini beyan ederim.

Betül ÇİÇEK ÖZKAN

ÖNSÖZ

Doktora eğitimine başladığım andan bu güne desteğini esirgemeyen, güler yüzlü, her zaman vakit ayıran, rahatlıkla danışabildiğim çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Hüseyin TURHAN'a da saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın konusunun belirlenmesinde ve hazırlanma sürecinin her aşamasında değerli bilgilerini ve zamanını benden esirgemeyen, bana laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan, her zaman güler yüzlü ve anlayışlı olan, her fırsatta çalışmamla yakından ilgilenen, danışman hocam Prof. Dr. Metin AK'a sonsuz teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

Deneylem sırasında bana yardımcı olan, güler yüzünü hiç eksik etmeyen, her konuyu sabırla tüm detayıyla anlatan ve çok güzel arkadaşlıklar kurmama vesile olan başta Dr. Tuğba SOĞANCI, Dr. Rukiye AYRANCI ve Merve GÜZEL olmak üzere Pamukkale üniversitesi İleri Polimerik Araştırmalar Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

TEKF.17.18 numaralı projeye desteklerinden dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimine teşekkür ederim.

Tezimin başından sonuna kadar beni maddi ve manevi her konuda destekleyen, bana her zaman anlayışla ve sabırla yaklaşan, sorunların çözümünde yardım eden çok kıymetli eşim Fahri ÖZKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tezime benimle başlayıp, benimle birlikte tüm zorlukları göğüsleyen, her zaman en büyük arkadaşım ve desteğim, yaşam enerjim olan sevgili küçük kızım Zeynep Beril'e yaşımdan büyük bir olgunlukla ve anlayışla bana yaklaştığı ve hep sevgisiyle yanımda olduğu için sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince benden hiçbir yardımı esirgemeyen, varlıklarıyla hep yanımda olan Annem Gülendam ÇİÇEK'e ve Babam İsa ÇİÇEK'e yürekten teşekkür ederim. Tezim süresince her zor anımda yanımda olan, beni sabırla dinleyen, manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim kız kardeşlerim Nihal AYDIN ve Zuhale ÇELİK'e candan teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca benden manevi desteğini esirgemeyen her zaman anlayışla yanımda olan arkadaşım Damla BAYRAKTAR'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
KISALTMALAR	xvii
SEMBOLLER LİSTESİ	xviii
1 GİRİŞ	1
1.1 İletken Polimerler	1
1.2 Biyosensörler	2
1.3 Çalışmanın Amacı	6
2 ELEKTROKİMYA VE ELEKTROKROMİZM.....	8
2.1 Elektrokimyanın Temelleri	8
2.1.1 Faraday Akımı	8
2.1.2 Kütle Transferi	8
2.2 Elektroanalitik Teknikler	9
2.2.1 Karışan Çözelti Tekniği.....	10
2.2.1.1 Nernst Difüzyon Tabakası.....	10
2.2.1.2 Hidrodinamik Voltametri.....	10
2.2.1.3 Amperometri.....	11
2.2.2 Durgun Çözelti Teknikleri	12
2.2.2.1 Dönüşümlü Voltametri.....	12
2.2.2.2 Kronoamperometri (Chronoamperometry)	14
2.3 İletken Polimerler ve Elektrokimyasal Polimerizasyon	15
2.3.1 İletken Polimerler	15
2.3.2 Elektrokimyasal Polimerizasyon	16
2.3.2.1 Elektrolitik Ortamın Etkisi.....	19
2.3.3 İletken Polimerlerde İletkenlik Mekanizması	20
2.3.3.1 Band Teorisi.....	21
2.3.3.2 İletken Polimerlerde Katkılama	22
2.4 Elektrokimyasal Teknikler için Kullanılan Ekipmanlar	24

2.4.1	Elektrokimyasal Hücre.....	24
2.4.2	Çalışma Elektrotu	24
2.4.3	Referans Elektrotu.....	25
2.4.4	Karşıt Elektrot.....	25
2.4.5	Potensiyostat.....	25
2.5	Elektrokromizm (Electrochromism)	26
2.5.1	Elektrokromik Malzeme Türleri.....	28
2.5.2	Spektroelektrokimya	29
2.5.3	Elektrokromik devreler (ECD).....	29
2.5.4	Elektrokromik Devrelerin Karakterizasyonu.....	30
2.5.4.1	Elektrokromik Zıtlık ve Dönüşüm Hızı	30
2.5.4.2	Açık Devre Hafızası ve Kararlılık	30
3	BİYOSENSÖRLER	32
3.1	Biyosensörlerin Temelleri.....	33
3.1.1	Elektrokimyasal Dönüştürücüler	34
3.1.2	Biyosensör proseslerinin temel prensipleri.....	37
3.2	Biyosensör Çeşitleri	37
3.3	Enzimler.....	39
3.3.1	İmmobilizasyon Teknikleri.....	39
3.3.1.1	Adsorpsiyon.....	41
3.3.1.2	Mikroenkapsülasyon	42
3.3.1.3	Yakalama (Entrapment).....	43
3.3.1.4	Kovalent Bağlama.....	43
3.3.1.4.1	Kitosan.....	45
3.3.1.4.2	Polimerizasyon	46
3.3.2	Enzim Kinetiği	47
3.3.3	Glikoz Oksidaz Enzimi	49
3.4	Elektrokimyasal Glikoz Biyosensörlerin Uygulamaları ve Çeşitleri.....	50
3.4.1	Birinci Nesil Glikoz Biyosensörler	52
3.4.2	İkinci Nesil Glikoz Biyosensörler	53
3.4.3	Üçüncü Nesil Glikoz Biyosensörler	54
3.4.4	Elektroaktif Girişimciler	55
4	MATERYAL VE METOT	56
4.1	Malzemeler	56
4.2	Kullanılan Cihazlar ve Elektrokimyasal Deneyler.....	57

4.2.1	Elektrokimyasal Hücre ve Elektrotların Hazırlanması	57
4.2.1.1	Elektrokimyasal Çalışmalar İçin ITO Kaplı Cam Elektrotun Hazırlanması	57
4.2.1.2	Biyosensör Çalışmaları İçin Grafit Elektrotun Hazırlanması	58
4.2.2	Elektrokimyasal Sistem.....	60
4.2.3	Elde Edilen Kompozit Filmlere Ait Elektrokimyasal Çalışmalar	60
4.2.4	Spektroelektrokimyasal Sistem	61
4.2.5	Elde Edilen Kompozit Filmlere ait Spektroelektrokimyasal Çalışmalar	61
4.2.5.1	Optik Kontrast ve Tepki Süresi Çalışmaları.....	62
4.2.5.2	In-situ Polimerizasyon	63
4.3	Kompozit Hazırlamada Kullanılan Monomerlerin Elektropolimerizasyonu ve Hazırlanan Kompozitlerin Redoks Davranışlarının Araştırılması	63
4.3.1	N ¹ ,N ⁴ -bis(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)tereftalamid (M1)'in Elektropolimerizasyonu ve CH-p(M1) Kompozitinin Redoks Davranışlarının Araştırılması	63
4.3.2	N ¹ ,N ³ ,N ⁵ -tris(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)benzen-1,3,5-trikarboksamid (M2)'nin Elektropolimerizasyonu ve CH-P(M2) Kompozitinin Redoks Davranışlarının Araştırılması.....	64
4.3.3	5-amino-N ¹ ,N ³ -bis (2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl) isoftalamid (M3) Sentezi ve CH-P(M3) Kompozitinin Redoks Davranışlarının Araştırılması.....	65
4.4	Biyosensör Çalışmaları.....	66
4.4.1	Enzimin Hazırlanması	66
4.4.2	pH Optimizasyonu	67
4.4.3	Kalibrasyon	67
4.4.3.1	Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırı	68
4.4.3.2	Lineerlik Saptama Sınırı	69
4.4.3.3	CH-P(M1) Enzim Elektrotunun Reaksiyon Kinetiği	69
4.4.4	Dönüşümlü Voltametri.....	70
4.4.5	Amperometri	71
4.4.6	Glikoz Deteksiyonuna Girişimci Madde Etkisi	71
4.4.7	Üretilen Biyosensörlerin Tekrarlanabilirliği ve Sürekliliği.....	71
4.4.8	Gerçek Örnek Analizi	72
4.5	Taramalı Elektron Mikroskobu	73
5	KİTOSAN (CH) / N ¹ ,N ⁴ - BİS (2,5 - Dİ (TİYOFEN-2-YL) - 1H – PİROL–1-YL) TEREFTALAMİD P(M1) KOMPOZİT FİLMİN KARAKTERİZASYONU	74
5.1	CH-P(M1) Kompozitinin Elektrokimyasal Karakterizasyonu ve Elektrokromik Özellikleri 74	
5.1.1	M1 Monomerinin CH ile Modifiye Edilmiş Elektrot Üzerindeki Elektropolimerizasyonu.....	74
5.1.2	CH-P(M1)'nin Elektrokimyasal Özellikleri.....	76

5.1.3	CH-P(M1)'nın Kararlılığı.....	77
5.1.4	CH-p(M1) Kompoziti İçin Yük Yoğunluğu.....	78
5.1.5	CH-p(M1)'nın Spektroelektrokimyasal Özellikleri	79
5.1.6	CH-P(M1) İçin Kinetik Çalışmaları.....	80
5.1.7	Yüzey Karakterizasyonu.....	82
5.2	CH-P(M1) Kompozit Filminin Biyosensör Özellikleri.....	84
5.2.1	CH-P(M1)-GOx Glikoz Biyosensörü için Optimizasyon	86
5.2.2	CH-P(M1)-GOx Glikoz Biyosensörü için Kalibrasyon Çalışmaları.....	88
5.2.3	CH-P(M1)-GOx Glikoz Biyosensörü ile Dönüştürümlü Voltametri Çalışmaları.....	90
5.2.4	CH-P(M1)-GOx Glikoz Biyosensörüne Girişimci Etkisi	93
5.2.5	CH-P(M1)-GOx Glikoz Biyosensörü ile Gerçek Örneklerde Glikoz Tayini	95
5.2.6	CH-P(M1)-GOx Biyoelektrotunun Stabilitesi	95
5.2.7	Grafit Elektrotu Yüzeyinde Morfolojik Araştırmalar	98
6	KİTOSAN (CH) - N ¹ ,N ³ ,N ⁵ -TRİS(2,5-Dİ(TİYOFEN-2-YL)-1H-PİROL-1-YL)BENZEN-1,3,5-TRİKARBOKSAMİD (M2) KOMPOZİT FİLMİN HAZIRLANMASI SPEKTROELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİ VE GLİKOZ BİYSENSÖRÜ	104
6.1	M2 Monomerinin CH ile Modifiye Edilmiş ITO Elektrotu Üzerindeki Elektropolimerizasyonu, Elektrokimyasal ve Elektrokromik Özellikleri	105
6.1.1	CH ile Modifiye Edilmiş ITO yüzeyinde M2 Monomerinin Elektropolimerizasyonu	105
6.1.2	CH-P(M2)'nın Elektrokimyasal Özellikleri.....	106
6.1.3	CH-P(M2) Kompoziti İçin Stabilitate Çalışması	107
6.1.4	CH-P(M2) Kompozitinin Elektriksel Yük Kapasitesi	108
6.1.5	CH-P(M2)'nın Spektroelektrokimyasal ve Elektrokromik Özellikleri.....	110
6.1.6	CH-P(M2) Kompoziti için Kinetik Çalışmaları.....	111
6.1.7	CH-P(M2) Kompozitinin Morfolojik Karakterizasyonu	114
6.2	CH-P(M2) Kompozit Filminin Biyosensör Özellikleri.....	117
6.2.1	CH-P(M2)-GOx Glikoz Biyosensörü için pH Optimizasyonu	118
6.2.2	CH-P(M2)-GOx Glikoz Biyosensörü için Kalibrasyon Çalışmaları.....	119
6.2.3	CH-P(M2)-GOx Glikoz Biyosensörüne Girişimci Madde Etkisi.....	121
6.2.4	CH-P(M2)-GOx Glikoz Biyosensörü ile Gerçek Örneklerde Glikoz Tayini	122
6.2.5	CH-P(M2)-GOx Sensör Platformunun Stabilitesi	123
6.2.6	Grafit CH-P(M2)-GOx Biyoelektrotunun Morfolojik Karakterizasyonu	125
7	KİTOSAN (CH) - 5-AMİNO-N ¹ ,N ³ -BİS (2,5-Dİ(TİYOFEN-2-YL)-1H-PİROL-1-YL) İSOFTALAMİD (M3) KOMPOZİT FİLMİN HAZIRLANMASI SPEKTROELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİ VE GLİKOZ BİYSENSÖRÜ	129

7.1	(M3) Monomerinin CH ile Modifiye Edilmiş ITO Elektrotu Üzerindeki Elektropolimerizasyonu, Elektrokimyasal ve Elektrokromik Özellikleri	129
7.1.1	CH ile Modifiye Edilmiş ITO Yüzeyinde (M3) Monomerinin Elektropolimerizasyonu	129
7.1.2	CH-P(M3)'nın Elektrokimyasal Özellikleri.....	131
7.1.3	CH-P(M3) Kompoziti İçin Stabilité Çalışması	132
7.1.4	CH-P(M3) Kompoziti İçin Elektriksel Yük kapasitesi	133
7.1.5	CH-P(M3)'nın Spektroelektrokimyasal ve Elektrokromik Özellikleri.....	135
7.1.6	CH-P(M3) Kompoziti İçin Redoks Reaksiyon Kinetiği Çalışması	136
7.1.7	ITO Elektrotu Yüzeyindeki CH-P(M3) Kompozitinin Morfolojik Karakterizasyonu .	139
7.2	CH-P(M3) Kompozit Filminin Biyosensör Özellikleri.....	142
7.2.1	CH-P(M3)-GOx Glikoz Biyosensörü için pH Optimizasyonu	143
7.2.2	CH-P(M3)-GOx Glikoz Biyosensörü için Kalibrasyon Çalışmaları.....	145
7.2.3	CH-P(M3)-GOx Glikoz Biyosensörü ile Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları.....	147
7.2.4	CH-P(M3)-GOx Glikoz Biyosensörüne Girişimci Etkisi	149
7.2.5	CH-P(M3)-GOx Glikoz Biyosensörü ile Gerçek Örneklerde Glikoz Tayini	150
7.2.6	CH-P(M3)-GOx Biyoelektrotunun Stabilitesi	151
7.2.7	Grafit CH-P(M3)-GOx Biyoelektrotunun Morfolojik Karakterizasyonu	154
8	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	160
9	KAYNAKLAR	165
10	ÖZGEÇMİŞ	182

ÖZET

KİTOSAN KATKILI İLETKEN POLİMERLERİN HAZIRLANMASI, ELEKTROKROMİK VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI

DOKTORA TEZİ

BETÜL ÇİÇEK ÖZKAN

**FIRAT ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ESNTİTÜSÜ
METALURJİ VE MALZEME MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİMDALİ**

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR HÜSEYİN TURHAN

İKİNCİ DANIŞMAN: PROF. DR. METİN AK

ELAZIĞ,2017

Kitosan iyi film olabilme özelliğine ve $-NH_2$ ve $-OH$ gibi aktif gruplara sahip olan bir biyopolimerdir. Yeni nesil amid sübstitüye 2,5-di(2-tiyenil) pirol (SNS) türevi elektroaktif monomerler, elektroaktif materyal uygulamalarında geniş yer bulan iyi optik, elektriksel iletkenlik ve stabilite özelliklerine sahip iletken polimerler sentezlenebilir.

Kitosan ve elektroaktif monomerler kullanılarak yeni bir metotla kompozit oluşturulması ve oluşturulan kompozitlerin elektrokimyasal, elektrokromik ve biyosensör özelliklerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda kompozit üretmek için indiyum tin oksit (ITO) kaplı cam elektrot ve grafit elektrot olmak üzere iki farklı elektrot kullanılmıştır. Kitosanın SNS türevi üç farklı monomer ile ITO elektrot yüzeyinde oluşturulan kompozitlerinin redoks özellikleri dönüşümlü voltametri tekniği ile araştırılmıştır. Ayrıca üretilen kompozitlerin optik özelliklerinin potansiyele bağlılığı, kinetik, elektrokromik, spektroeletrokimyasal davranışları incelenmiştir. Aynı yöntemle grafit elektrot yüzeyinde kompozitler oluşturulmuş ve oluşturulan kompozit malzemelere glikoz oksidaz enzimi immobilize edilerek amperometrik yöntemle glikoz sensörü olabilme özellikleri araştırılmıştır. Bunun yanında hem ITO elektrotu yüzeyinde hazırlanan hem de grafit elektrot yüzeyinde hazırlanan kompozit malzemelerin SEM ile morfolojik karakterizasyonu yapılmıştır.

Oluşturulan kompozit malzemelerle iletken polimerlerin optik ve elektriksel özellikleri geliştirilerek elektrokromik uygulamalar için istenen düzeyde optik kontrast, stabilite ve tepki zamanına sahip malzemeler, biyosensör uygulamaları için de oldukça iyi kararlığa ve seçiciliğe sahip, ticari uygulamalar için uygun sensör platformu tasarlanarak glukoz biyosensörleri elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İletken polimer, Kitosan, Elektrokimya, Elektrokromizm, Biyosensör, Glikoz oksidaz



ABSTRACT

PREPARING CONDUCTIVE POLYMERS CONTAINING KITOSAN FOR ELECTROCHROMIC AND BIOSENSOR APPLICATIONS

DISSERTATION

BETÜL ÇİÇEK ÖZKAN

**FIRAT UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
METALLURGICAL AND MATERIALS ENGINEERING**

(SUPERVISORS: PROF. DR. HÜSEYİN TURHAN, PROF. DR. METİN AK)

ELAZIĞ, 2017

Conducting polymers (CP) with extraordinary optical, electrical, conductivity and stability properties can be synthesized from new generation amide-substituted 2,5-di (2-thienyl) pyrrole (SNS) derived electroactive monomers used in divers field of electroactive material applications and researches.

The objective of this study was to produce new composite materials by using electroactive monomers and chitosan (CH) with a novel composite preparation method and to characterize electrochemical, electrochromic and biosensor properties of produced composite films. For this purpose, to prepare composites with a new method, it was used indium tin oxide coated (ITO) glass electrode and graphite electrode. Three different SNS derived monomers were electrochemically deposited on the CH modified ITO electrode surface, respectively and redox behavior of resulting composite films have been studied by cyclic voltammetry (CV). Moreover, the electrochromic, spectroelectrochemical properties and the kinetic of redox reaction of the composite films were investigated. For biosensor studies, same CH/CP composite films have been prepared on the graphite electrode surface and each one used as an immobilization matrix for glucose oxidase. After biosensor preparation, the working condition of biosensor was optimized and biosensing abilities and properties such as stability, selectivity

and interference effects were studied. The surface morphologies of the composite films on ITO and graphite surfaces were characterized by scanning electron microscopy (SEM).

According to the result of studies, it was figured out that the aimed composite film was generated on ITO electrode surface and they have good optical and electrochemical properties. However, the produced enzyme immobilization platforms for GOx on the graphite electrode surface had good stability and selectivity and they are convenient for practical applications.

Key Words: Conducting Polymer, Chitosan, Electrochemical and Electrochromic properties, Biosensor, Glucose Oxidase

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 (a) N ¹ ,N ⁴ -bis(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)tereftalamid (M1), (b) N ¹ ,N ³ ,N ⁵ -tris(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)benzen-1,3,5-trikarboksamid (M2), (c) 5-amino-N ¹ ,N ³ -bis(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)isofhtalamid (M3).....	6
Şekil 2.1 (a) Tipik elektrot potansiyel artışı, (b) Potansiyel artışına karşılık gelen akım çıktısı	11
Şekil 2.2(a) Amperrometrik deneylerde potansiyel zaman arasındaki ilişki, (b) Amperometrik testlerde analit eklenmeden ve eklendikten sonra akımda meydana gelen değişim (c) Art arda analit eklenmesi ile tipik bir amperometrik hücrenin grafiği	12
Şekil 2.3(a) Dönüşümlü voltametri için girdi dalga şekli (b) Tersinir bir redox çifti için tipik dönüşümlü voltametri çıktısı.....	13
Şekil 2.4 (a) Uygulanan potansiyelin zamana göre değişimi, (b) Uygulanan potansiyel sonucu akımda zamanla meydana gelen değişim.....	14
Şekil 2.5 Literatürde ve ticari olarak bulunan bazı iletken polimerin kimyasal yapıları (Soğancı, 2017)	16
Şekil 2.6 X= N-H, S, O olduğunda radikal-katyonun oluşumu hususunda beş elemanlı heterocyclic bileşenin rezonans stabilizasyonu	17
Şekil 2.7 X= N-H, S, O olduğunda radikal-katyon/monomer ve radikal-katyon/radikal-katyon eşleşmesi	17
Şekil 2.8 ECE Mekanizması	18
Şekil 2.9 İletken bir polimerde undoping, p-doping	18
Şekil 2.10 Oksidatif Polimerizasyon süresince pirolün eşleşme reaksiyonları	19
Şekil 2.11 İletken, yarı iletken ve yalıtkanlara ait bant boşluğu teorisi	21
Şekil 2.12 Politiyofenin p-tip dopingi.....	23
Şekil 2.13 Üç elektrot sistemini temel alan bir voltametrik hücrenin şematik diyagramı. CE: karşıt elektrot (Counter Electrode), WE çalışma elektrotu (Working Electrode), RE: referans elektrot (Reference Electrode)	24
Şekil 2.14 Üç elektrotlu bir potensiyostatın basitleştirilmiş döngü diyagramı.	26
Şekil 2.15 Bozulmamış temel durumda konjuge polimer için p-doping ile elektronik band yapısının değerlendirilmesi.....	27
Şekil 2.16 ECD'nin şematik gösterimi.....	30
Şekil 3.1 Biyosensör bileşenleri.....	34
Şekil 3.2 Biyosensörlerin genel şematik planı	37
Şekil 3.3 (a) Adsorpsiyon yoluyla enzim tutuklanması (b) Elektrot üzerinde antijen/antikor topluluğu (Lojou & Bianco, 2006)	41
Şekil 3.4 Membran elektrotu (Lojou & Bianco, 2006)	42
Şekil 3.5 (a) Jel/Polimer tutuklanması; (b) Çapraz bağlanma ile tutuklanma (Lojou & Bianco, 2006).....	43
Şekil 3.6 Kovalent bağlanma (Lojou & Bianco, 2006).....	44
Şekil 3.7 Katı bir destek üzerine enzimin kovalent bağlanması (a) enzimin karboksil grupları aktifleştirilerek, (b) enzimin amino grupları aktive edilerek.....	45
Şekil 3.8 Kitosanın kimyasal yapısı	45
Şekil 3.9 Elektrokimyasal polimerizasyonda en çok kullanılan monomerler	46
Şekil 3.10 Reaksiyon hızına karşı substrat konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi.	48
Şekil 3.11 β-D glikoz ile GOx'in reaksiyonunun şematik gösterimi (D'Costa vd., 1986)	49
Şekil 3.12 Tipik bir elektrokimyasal biyosensörde elektron transferinin şematik gösterimi (Chou, 2011)	51

Şekil 3.13 Glikoz tanınması için üç nesil amperometrik enzim elektrotu (a) Oksijen kofaktör kullanımı, (b) Suni redoks mediyatör, (c) Elektrot ve GOx arasında direkt elektron transferi; S: Substrat; Ü: Ürün (Chou, 2011)	51
Şekil 3.14 Birinci nesil biyosensör	52
Şekil 3.15 İkinci nesil biyosensör	54
Şekil 4.1 Cam elektrokimyasal hücre	58
Şekil 4.2 Amperometrik biyosensör hücresi	59
Şekil 4.3 Grafit elektrot tabanında, CH-CP kompozit malzemesi temel alınarak üretilen glikoz biyosensörü yapılandırmak için kullanılmış olan ‘tabaka-tabaka damlatma yoluyla kaplama’ fabrikasyon prosedürünü özetleyen şematik diyagram	60
Şekil 4.4 Elektroaktif (M1) monomeri için sentez şeması	63
Şekil 4.5 Elektropolimerizasyon ile p(M1) oluşumu	64
Şekil 4.6 N ¹ ,N ³ ,N ⁵ -tris(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)benzen-1,3,5-trikarboksamid (M2) sentez şeması	64
Şekil 4.7 Elektropolimerizasyon ile p(M2) oluşumu	65
Şekil 4.8 5-amino-N ¹ ,N ³ -bis(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)isofthalamid (M3) sentez şeması	65
Şekil 4.9 Elektropolimerizasyon ile p(M3) oluşumu	66
Şekil 4.10 Biyosensör için kalibrasyon grafiği	67
Şekil 4.11 Kalibrasyon grafiğinden elde edilen lineer grafik	69
Şekil 4.12 Michaelis-Menten kinetiği için Lineweaver–Burke grafiği	70
Şekil 5.1 CH modifiyeli ITO kaplı cam elektrot üzerinde 0,05 M M1 için 250mV/s tarama hızında 0,1M LiClO ₄ /ACN destek elektrolit çözücü sistemi için dönüşümlü voltamogramlar	76
Şekil 5.2 CH-P(M1) için (a) farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri, (b) Katodik ve anodik pik potansiyellerinin akıma göre değişimi, monomersiz 0,1 M LiClO ₄ /ACN ortamında	77
Şekil 5.3 CH-P(M1) için 250mV/s tarama hızında monomersiz 0,1 M LiClO ₄ /ACN ortamında 1. ve 500. dönüşümlü voltamogramlar	78
Şekil 5.4 CH-P(M1) için 500 mV/s tarama hızında 0,1 M LiClO ₄ /ACN ortamında yük yoğunluğunu göstermek için alınmış dönüşümlü voltamogram	79
Şekil 5.5 Uygulanan farklı potansiyellerde, 0,1 M LiClO ₄ /ACN ortamında CH-P(M1) kompoziti için UV-vis spektrumları	80
Şekil 5.6 CH-P(M1) için 0,1 M LiClO ₄ /ACN destek elektrolit çözücü sisteminde, 427 ve 900 nm’de Absorbans-Zaman grafikleri	82
Şekil 5.7 a) 5000 kez büyütülmüş boş ITO cam elektrot b) 5000 kez büyütülmüş 15 µl CH ile modifiye edilmiş ITO cam elektrot için SEM fotoğrafları	83
Şekil 5.8 Elektrokimyasal olarak P(M1) ile kaplanmış ITO elektrot yüzeyi için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 40000 kez büyütülmüş SEM fotoğrafları	83
Şekil 5.9 CH-P(M1) ile kaplanmış ITO elektrot yüzeyi için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 40000 kez büyütülmüş SEM fotoğrafları	84
Şekil 5.10 Biyosensör elektrotunun üretimi	85
Şekil 5.11 CH-P(M1) biyosensörü üzerinde pH etkisi (0,1 M sodyum fosfat tamponu içerisinde, -0,7V)	87
Şekil 5.12 CH-P(M1) enzim elektrotu için kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,0, -0,7V). Hata çubukları üç ölçüm sonucunda elde edilen standart sapmayı gösterir.	88
Şekil 5.13 Çalışma hücresine 25 mM glikoz eklendikten sonra akımın zamana bağlı olarak değişimi (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, Ph 5, -0,7 V)	89
Şekil 5.14 CH-P(M1) biyosensörü için lineer kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,0, -0,7V).	89
Şekil 5.15 CH-P(M1) enzim elektrotu için Lineweaver–Burke grafiği	90

Şekil 5.16 Grafit elektrot yüzeyine (a) CH-P(M1) ile kaplanıp glikoz eklenmeden, (b) CH-P(M1) ile kaplanıp çalışma hücresine 25 mM glikoz eklenerek, (c) CH-P(M1)-GOx-GAL ile kaplanıp glikoz eklenmeden, (d) CH-P(M1)-GOx-GAL ile kaplanıp çalışma hücresine 25 mM glikoz eklenerek yapılan CV çalışmaları (0,1M sodyum fosfat içerisinde, pH 5, tarama hızı 0,025 V/s, Ag/AgCl referans elektrotuna karşı, -0,4 V ve 1,4 V aralığında)	92
Şekil 5.17 Grafit elektrot yüzeyine (a) CH-P(M1) ile kaplanıp, (b) CH-P(M1)-GOx-GAL ile kaplanıp çalışma hücresine glikoz eklenmeden ve 25 mM glikoz eklenerek yapılan CV çalışmaları (0,1M sodyum fosfat içerisinde, pH 5, tarama hızı 0,025 V/s, Ag/AgCl referans elektrotuna karşı)	93
Şekil 5.18 CH-P(M1)-GOx glikoz biyosensörüne ortamdaki girişimci etkisi (pH 5, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda).....	94
Şekil 5.19 CH-P(M1)-GOx glikoz biyosensörünün etanol + glikoz enjeksiyonuna verdiği cevap (3 tekrar, pH 5, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda)	94
Şekil 5.20 CH-P(M1)-GOx için (a) Biyoelektrotun art arda yapılan testlere verdiği cevap, (b) Tekrarlanabilirlik (Çalışma hücresine 5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 5’de).....	96
Şekil 5.21 CH-P(M1)-GOx için Stabilité çalışması (5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 5’de).....	96
Şekil 5.22 CH-GOx glikoz biyosensörünün art arda yapılan testlere verdiği cevaplar	97
Şekil 5.23 Boş grafit elektrot için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri	98
Şekil 5.24 CH ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 10000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri	99
Şekil 5.25 P(M1) ile elektrokimyasal yolla kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 10000 kez büyütülmüş, (c) 40000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri	100
Şekil 5.26 CH-P(M1) ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 10000 kez büyütülmüş, (c) 40000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri	101
Şekil 5.27 CH-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri	102
Şekil 5.28 P(M1)-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri	102
Şekil 5.29 CH- P(M1)-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri	103
Şekil 6.1 CH modifiyeli ITO kaplı cam elektrot üzerinde 0,05 M M2 için 250mV/s tarama hızında 0,1 M TBP6/DCM destek elektrolit çözücü sistemi için dönüşümlü voltamogramlar	106
Şekil 6.2 CH-P(M2) için (a) farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri, (b) Katodik ve anodik pik potansiyellerinin akıma göre değişimi, monomersiz 0,1 M TBP6/DCM ortamında	107
Şekil 6.3 CH-P(M2) için 250mV/s tarama hızında monomersiz 0,1 M TBP6/DCM ortamında 1. ve 200. dönüşümlü voltamogramlar.....	108
Şekil 6.4 CH-P(M2) için 500 mV/s tarama hızında 0,1 M TBP6/DCM ortamında yük yoğunluğunu göstermek için alınmış dönüşümlü voltamogram	109
Şekil 6.5 CH-P(M2)’ya ait spektroeletrokimya grafiği.....	110
Şekil 6.6 CH-P(M2) için 0,1 M TBP6/DCM destek elektrolit çözücü sisteminde, 355 ve 910 nm’de Absorbans-Zaman grafikleri	112
Şekil 6.7 (a) CH-P(M2) için UV-vis spektrumları, (b) CH-P(M2) için 900 nm’de zamana bağlı absorbans değişim grafiği.....	114
Şekil 6.8 Boş ITO kaplı cam elektrot (5000 x)	115
Şekil 6.9 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde CH için SEM görüntüsü (5000 x)	115
Şekil 6.10 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde P(M2) için SEM görüntüsü (20000 x)	116

Şekil 6.11 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde CH-P(M2) için SEM görüntüsü (20000 x).....	117
Şekil 6.12 Biyosensör elektrotunun üretimi.....	118
Şekil 6.13 CH-P(M2) biyosensörü üzerinde pH etkisi (0,1 M sodyum fosfat tamponu içerisinde, -0,7V).....	119
Şekil 6.14 CH-P(M2) enzim elektrotu için kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,0, -0,7V).	120
Şekil 6.15 CH-P(M2) biyosensörü için lineer kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,0, -0,7V).	120
Şekil 6.16 CH-P(M2) enzim elektrotu için Lineweaver–Burke grafiği	121
Şekil 6.17 CH-P(M2)-GOx glikoz biyosensörüne ortamdaki girişimci etkisi (pH 4, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda).....	122
Şekil 6.18 CH-P(M2)-GOx için (a) Biyoelektrotun art arda yapılan testlere verdiği cevap, (b) Tekrarlanabilirlik (Çalışma hücre sine 7,5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 4'de).....	124
Şekil 6.19 CH-P(M2)-GOx için Stabilité çalışması (7,5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 4'de).....	124
Şekil 6.20 Boş grafit elektrot için (a) 5000 kez büyütölmüş, (b) 20000 kez büyütölmüş SEM görüntöleri.....	125
Şekil 6.21 CH ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütölmüş, (b) 10000 kez büyütölmüş SEM görüntöleri.....	126
Şekil 6.22 P(M2) ile kaplanmış Grafit elektrotu için SEM görüntöleri (a) 20000, (b) 40000 kez büyütölmüş.....	127
Şekil 6.23 Grafit elektrotu üzerinde CH-P(M2) kompozitinin (a) 20000, (b) 40000 kez büyütölmüş SEM görüntöleri.....	128
Şekil 6.24 CH-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütölmüş, (b) 20000 kez büyütölmüş SEM görüntöleri.....	128
Şekil 7.1 CH modifiyeli ITO cam elektrot üzerinde 0,02 M M3 için 250mV/s tarama hızında 0,1 M LiClO ₄ /ACN destek elektrolit çözöcü sistemi için dönuşömlü voltamogramlar	131
Şekil 7.2 CH-P(M3) için (a) farklı tarama hızlarında dönuşömlü voltametri, (b) Katodik ve anodik pik potansiyellerinin akıma göre değişimi, monomersiz 0,1 M LiClO ₄ /ACN içeren çalışma hücre sine 132	
Şekil 7.3 CH-P(a-M3) için 250mV/s tarama hızında monomersiz 0,1 M LiClO ₄ /ACN ortamında 1. ve 200. dönuşömlü voltamogramlar.....	133
Şekil 7.4 CH-P(M3) için 500 mV/s tarama hızında 0,1 M LiClO ₄ /ACN ortamında yük yoğunluğunu göstermek için alınmış dönuşömlü voltamogram	134
Şekil 7.5 CH-P(M3)'ya ait spektroeletrokimya grafiği.....	136
Şekil 7.6 CH-P(M3) için 0,1 M LiClO ₄ /ACN destek elektrolit çözöcü sisteminde, 420 ve 890 nm'de Absorbans-Zaman grafikleri	137
Şekil 7.7 (a) CH-P(M3) için UV-vis spektrumları, (b) CH-P(M3) için 900 nm'de zamana bağlı absorbans değişim grafiği.....	139
Şekil 7.8 Boş ITO kaplı cam elektrot (5000 x).....	140
Şekil 7.9 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde CH için SEM görüntüsü (5000 x)	140
Şekil 7.10 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde P(M3) için SEM görüntüsü (20000 x)	141
Şekil 7.11 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde CH-P(M3) için SEM görüntüsü (20000 x).....	141
Şekil 7.12 Biyosensör elektrotunun üretimi.....	142
Şekil 7.13 CH-P(M3) biyosensörü üzerinde pH etkisi (0,1 M sodyum fosfat tamponu içerisinde, -0,7V).....	144
Şekil 7.14 CH-P(M3) enzim elektrotu için kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,0, -0,7V). Hata çubukları üç ölçüm sonucunda elde edilen standart sapmayı gösterir.	145

Şekil 7.15 CH-P(M3) biyosensörü için lineer kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,5, -0,7V). Hata çubukları üç ölçüm sonucunda elde edilen standart sapmayı gösterir.....	146
Şekil 7.16 CH-P(M3) enzim elektrotu için Lineweaver–Burke grafiği	147
Şekil 7.17 Grafit elektrot yüzeyine (a) P(M3)-GOx ile kaplanıp, (b) CH-P(M3)-GOx ile kaplanıp çalışma hücreğine glikoz eklenmeden ve 25 mM glikoz eklenerek yapılan CV çalışmaları. (0,1M sodyum fosfat içerisinde, pH 5,5, tarama hızı 0,025 V/s, Ag/AgCl referans elektrotuna karşı)	148
Şekil 7.18 Grafit elektrot yüzeyine (a) P(M3)-GOx ile kaplanıp çalışma hücreğine glikoz eklenmeden, (b) CH-P(M3)-GOx ile kaplanıp çalışma hücreğine 25 mM glikoz eklenerek yapılan CV çalışmaları. (0,1M sodyum fosfat içerisinde, pH 5,5, tarama hızı 0,025 V/s, Ag/AgCl referans elektrotuna karşı)	149
Şekil 7.19 CH-P(M2)-GOx glikoz biyosensörüne ortamdaki girişimci etkisi (pH 4, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda, hata çubukları 3 test sonucu elde edilen standart sapmayı ifade eder)	150
Şekil 7.20 CH-P(M3)-GOx için (a) Biyoelektrotun art arda yapılan testlere verdiği cevap, (b) Tekrarlanabilirlik (çalışma hücreğine 5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 5,5’de).....	152
Şekil 7.21 CH-P(M3)-GOx için Stabilite çalışması (7,5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 4’de).....	153
Şekil 7.22 Boş grafit elektrot için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri	154
Şekil 7.23 CH ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 10000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri	155
Şekil 7.24 P(M2) ile kaplanmış Grafit elektrotu için SEM görüntüleri (a) 20000, (b) 40000 kez büyütülmüş	156
Şekil 7.25 CH-P(M3) ile kaplanmış Grafit elektrotu için SEM görüntüleri (a) 5000, (b) 20000 ve (c) 40000 kez büyütülmüş	157
Şekil 7.26 CH-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri	158
Şekil 7.27 P(M3)-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için SEM görüntüleri (a) 5000, (b) 10000 kez büyütülmüş	158
Şekil 7.28 CH-P(M3)-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000, (b) 10000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri	159

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.1 Sentez yılına göre kronolojik sıra ile iletken polimerler ve sentezleyen bilim insanları.....	2
Tablo 1.2 Biyosensörlerin kronolojik gelişimi	5
Tablo 1.3 Bu çalışma kapsamında hedeflenen ve yapılan çalışmalar.....	7
Tablo 3.1 Potansiyel elektrokimyasal girişimcilerin listesi ^a	55
Tablo 5.1 P(M1) ve CH-P(M1) için $E_{onset,ox}$, Stabilite ve CD değerleri.....	79
Tablo 5.2 P(M1) ve CH-P(M1) için optik ve elektrokimyasal veriler.....	82
Tablo 5.3 1,4 V sabit potansiyelde elektropolimerizasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi	87
Tablo 5.4 CH-p(M1) biyosensörü kullanarak ve spektrofotometrik yöntemi kullanarak içecekler içerisindeki toplam glikoz miktarının saptanması sonuçları	95
Tablo 5.5 CH, P(M1) ve CH-P(M1) enzim immobilizasyon platformları (n = test sayısı).....	97
Tablo 6.1 P(M2) ve CH-P(M2) için $E_{onset,ox}$, Stabilite ve CD değerleri.....	109
Tablo 6.2 P(M2) ve CH-P(M2) için optik ve elektrokimyasal veriler.....	113
Tablo 6.3 CH-p(M2) biyosensörünü kullanarak ve spektrofotometrik yöntemi kullanarak içecekler içerisindeki toplam glikoz miktarının saptanması sonuçları	123
Tablo 6.4 CH, P(M2) ve CH-P(M2) enzim immobilizasyon platformları (n = test sayısı, 0,1M sodyum fosfat tamponunda, pH 4'te, çalışma hücreğine 25mM glikoz enjekte edilerek)	125
Tablo 7.1 P(M2) ve CH-P(M2) için $E_{onset,ox}$, Stabilite ve CD değerleri.....	134
Tablo 7.2 P(M1) ve CH-P(M1) için optik ve elektrokimyasal veriler.....	137
Tablo 7.3 1,5 V sabit potansiyelde elektropolimerizasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi	145
Tablo 7.4 CH-p(M1) biyosensörü kullanarak ve spektrofotometrik yöntemi kullanarak içecekler içerisindeki toplam glikoz miktarının saptanması sonuçları	151
Tablo 7.5 P(M3) ve CH-P(TPPA) enzim immobilizasyon platformları (n = test sayısı, 0,1M sodyum fosfat tamponunda, pH 5'te, çalışma hücreğine 25mM glikoz enjekte edilerek)	153
Tablo 8.1 ITO elektrotu üzerinde üretilen kompozitlerin elektrokimyasal ve spektroeletrokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması	161
Tablo 8.2 Çalışmada üretilen biyosensörler ve özellikleri	163

KISALTMALAR

ACN	:	Asetonitril
DCM	:	Dikloro metan
WE	:	Çalışma Elektrotu
RE	:	Referans Elektrot
CE	:	Karşıt Elektrot
PAC	:	Poliasetilen
PANI	:	Polianilin
PPy	:	Polipirol
PPh	:	Polifenilen
PTh	:	Politiyofen
PEDOT	:	Poli(etilen dioksi tiyofen)
SNS	:	2,5-ditiyenil pirol
GOx	:	Glikoz Osidaz
GAL	:	Glutar Aldehit
CH	:	Kitosan
CV	:	Dönüşümlü Voltametri
HOMO	:	En yüksek enerjili orbital
LUMO	:	En düşük enerjili orbital
CB	:	İletim bandı
VB	:	Valens bandı
LOD	:	Gözlenebilme Sınırı
CD	:	Yük Yoğunluğu
CP	:	İletken Polimer

SEMBOLLER LİSTESİ

t_s	: Tepki süresi
n	: Transfer olan elektron sayısı
J	: Akı
F	: Faraday sabiti, eşitlik başına 96 487 C
A	: Elektrotun Yüzey alanı (cm^2)
D	: Difüzyon sabiti [m^2s^{-1}],
i_p	: Tersinir bir sistemde pik akımı
E_{up}	: Uygulama Potansiyeli
E_{pc}	: Katodik pik potansiyeli
E_{pa}	: Anodik pik potansiyeli
$E_{onset,ox}$	: Başlangıç oksidasyon potansiyeli
i_{pc}	: Katodik pik akımı
i_{pa}	: Anodik pik akımı
E_g	: Bant Boşluğu
π	: Pi bağı
σ	: Standart sapma
K_m	: Michaelis-Menten Sabiti
λ_{max}	: Maksimum Dalga Boyu

1 GİRİŞ

1.1 İletken Polimerler

Polimerler, yani plastikler, metallerin aksine yalıtkan ve elektriği iletmeyen maddeler olarak bilinmekteydi ve bu özelliği ile de elektrik tellerinin kaplanması yalıtımında kullanılmaktaydı. Ancak, Alan J. Heeger, Alan G. MacDiarmid ve Hideki Shirakawa isimli bilim adamları yaptıkları buluşlarıyla bir polimer olan poliasetilenin hemen hemen bir metal gibi iletken olabileceğini ilk kez gösterdiler. Bu buluşla polimerlerin hep yalıtkan olan imajı da değiştirilmiş oldu. İlk iletken plastikler kazara Almanya'daki BASF plastik araştırma laboratuvarında aromatik bileşiklerin oksidatif kuplaj çalışmaları sırasında keşfedilmiştir (Shirakawa, Louis, MacDiarmid, Chiang, & Heeger, 1977) (Pron & Rannou, 2002).

Poliasetilen, Shirakawa ve arkadaşları tarafından 1974 te, Ziegler Natta (K. Ziegler ve G. Natta; Nobel 1966 kimya ödülü) katalizini kullanarak, asetilenden gümüş renkli, parlak görümlü bir film hazırlayana kadar siyah bir toz olarak bilinirdi. Fakat o metalik görünümüne rağmen henüz bir iletken değildi. Bununla birlikte, 1977 de, Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger iyot buharı ile yükseltgenme (oxidation) yaptırdıkları polimer filmlerinin, orijinal hallerinden, 10^9 kez daha iletken olduklarını buldular. Polimerlerin halojenlerle muamelesi yarı iletkenlerdekine benzer biçimde “katkılama” (doping) olarak isimlendirilen durumu ortaya çıkarmıştır. Poliasetilenin “katkılı” hali metre başına 10^5 Siemens’lik bir iletkenliğe sahiptir. Bu da daha önce bilinen polimerlerinkinden epeyce yüksek bir değerdir. Bir kıyaslama yapılacak olursa, iyi bir yalıtkan olan teflonun iletkenliği 10^{-16} S m⁻¹ iken ve gümüş ile bakırınki 10^8 S m⁻¹ dir (Groenendaal, Jonas, Freitag, Pielartzik, & Reynolds, 2000) (Bühm, 1993) (Shirakawa vd., 1977).

Literatüre yer alan iletken polimerler sentezleyen kişiye ve sentez yılına göre kronolojik sıralamayla Tablo 1.1’de verilmiştir.

Tablo 1.1 Sentez yılına göre kronolojik sıra ile iletken polimerler ve sentezleyen bilim insanları

İletken Polimer	Sentezleyen	Yılı	Kaynak
Polianilinin (PANI)	Rodwell	1862	(Rodwell, 1862)
Poliasetilen (PAC)	Natta ve diğerleri	1952	(Natta, 1958)
Poliasetilen (PAC) (yeniden)	Shirakawa ve diğerleri	1977	(Shirakawa vd., 1977)
Polipirol (PPy)	Diaz ve diğerleri	1979	(Diaz, Kanazawa, & Gardini, 1979)
Polifuran	Tourillon ve Garnier	1982	(Tourillon & Garnier, 1982)
Polianilin (PAn)	MacDiarmid ve Epstein	1989	(MacDiarmid & Epstein, 1989)
Poli(p-fenilen) (PPh)	Grem ve diğerleri	1992	(Grem, Leditzky, Ullrich, & Leising, 1992)
Politiyofen (PTh)	Mortimer	1999	(“Organic electrochromic materials”, 1999)
Poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT)	Ventosa ve diğerleri	2008	(Ventosa vd., 2008)

İletken polimer malzemelere olan ilgi Shirakawa tarafından 1977 yılında ilk kez iletken olduğu keşfedildiğinden beri her geçen yıl artarak büyümektedir. Geleneksel polimerlerin sahip olduğu kolay işlenebilirlik, ucuzluk, kolay ve yaygın olarak bulunabilme gibi özelliklere sahip olmalarının yanı sıra elektriksel olarak iletken olmaları ve elektrokromik özellikler gösteren malzemeler olmaları bilim dünyasında ve ticari pratik uygulamalarda iletken polimere olan ilginin büyük olmasına sebep olmaktadır. Organik alan etkili transistörler, organik ışık yayan diyotlar, fotovoltaik cihazlar ve akıllı cam sistemleri gibi birçok uygulamada iletken polimerler hem kullanılmaktadır hem de geliştirilmeye çalışılmaktadır.

İletken polimerler sahip oldukları özellikler ve geliştirilebilme potansiyelleri sayesinde gelecekte birçok önemli uygulamada aktif rol almaya ve bilim insanlarının dikkatini çekmeye devam edecektir.

1.2 Biyosensörler

Glikoz en çok yapılan biyolojik tayindir ve milyonlarca diyabet hastası kanlarındaki glikoz düzeyini günlük olarak ölçmektedirler. Glikoz biyosensörlerinin biyosensör pazarının 85% ine sahip olduğu tahmin edilmektedir. Böylesine geniş bir pazar hacminden dolayı yeni biyo

algılama fikirlerinin ve teknolojilerinin geliştirilmesi için diyabet oldukça önemli bir konu olmuştur. Son yıllarda yeni araştırmalar ve yenilikçi stratejiler öne sürülmüş, çok sayıda çalışma yayınlanmış ve patentler yapılmıştır. Glikoz oksidaz (GOx) temelli, amperometrik enzim elektrotlu biyosensörler kullanımı kolay, basit glikoz test metotlarının geliştirilmesinde öncü rol oynamışlardır (Taylor & Schultz, 1996) (Shrestha vd., 2016).

Kitosan (CH) doğal biyouyumlu, biyolojik olarak bozunabilir, yüksek mekanik dayanıma sahip ve çok iyi film oluşturabilme yeteneğine sahip bir biyopolimerdir. Kitosanın çeşitli araştırmalar ve çalışmalar için ilgi çekmesinin sebebi sahip olduğu çok sayıdaki fonksiyonel grup ve mükemmel film oluşturma yeteneğidir. Kitosan sahip olduğu amin ve hidroksil gruplar sayesinde özellikle biyomolekül immobilizasyonu için oldukça elverişlidir (Di Carlo vd., 2012) (Reza, Ali, Srivastava, Agrawal, & Biradar, 2015).

Elektrokimyasal olarak üretilmiş polimerlerin enzim immobilizasyonu için biyosensörlerde kullanılması üretimin kolay olması, film kalınlığının ayarlanabilmesi ve seçiciliğinin iyi olması gibi sebeplerden dolayı gelecek vadeden bir teknolojidir. Ayrıca iyi iletkenlik özelliği ve yüksek stabilitesi sebebiyle elektrokimyasal biyosensör yapılarında sıkça iletken polimerler kullanılmaktadır (Tang, Li, Wu, Gong, & Zeng, 2014) (Shrestha vd., 2016).

İlk elektrokimyasal biyosensör çalışması 1956 yılında Cincinnati Ohio'da bir çocuk hastanesinde Dr. L. Clark tarafından çözülmüş oksijen konsantrasyonunu ölçmek amacıyla yapıldı. Ayrıca Clark ve grubu 1962 yılında kardiyovasküler cerrahide sürekli görüntüleme için enzim temelli bir glikoz sensörünü literatüre kazandırdı (Clark & Lyons, 1962). Biyosensör araştırmalarının öncüsü bu konsept bir test çözeltisindeki glikoz konsantrasyonunun ölçümü için Clark oksijen elektrotu üzerinde GOx enziminin tutuklanmasını kapsar. Bu prototip ilk ticarileştirilmiş enzim elektrotunun ve glikoz analiz edicisinin gelişimi için temel oluşturmuştur. Glikoz analizi, küçük glikoz metreler kullanılarak diyabet hastalarında hayati öneme sahip olan kandaki glikoz seviyesini kontrol etmek amacıyla düşünülmüştür (Taylor & Schultz, 1996) (Clark & Lyons, 1962).

Sensör çalışmaları 1970'lerden itibaren boyut ve kolay kullanım bakımından önemli gelişmeler göstermiştir. Updike ve Hicks (Updike & Hicks, 1967) ikili oksijen çalışma elektrotları (bunlardan biri enzim ile kaplanmış) kullanarak ve numunedeki oksijen değişimlerini doğrulamak için diferansiyel akımı ölçerek bu prensibi daha ileriye taşıdılar. 1973 yılında

Guilbault ve Lubrano (Guilbault & Lubrano, 1973) hidrojen peroksitin amperometrik (anodik) görüntülenmesine dayanan kandaki glikozun ölçümü için bir enzim elektrotu tasarladılar. Tasarlanan bu biyosensör ile 100 µL'lik kan numunesi test edildiğinde oldukça kesin sonuçlar elde edildi.

1980'lerde biyoteknolojide biyosensör araştırmaları birçok araştırmacının ilgisini çeken önemli bir konu haline geldi (Newman & Turner, 2005). Bu dönemde mediyatör temelli ikinci jenerasyon glikoz biyosensörlerde önemli gelişmeler oldu (Cass vd., 1984), ticari evde glikoz ölçümü yapan screen-printed şeritler ile yapılan cihazların (Matthews vd., 1987) ve sensör performansını arttırmak için modifiye edilmiş elektrotlar ve uygun membranlar/kaplamaların kullanımı geliştirilmesine odaklanıldı (Murray, Ewing, & Durst, 1987).

Asıl atılım ise 1990'larda ölçüm için gerekli kan hacminin azaltılması ve glikozun düşük ve yüksek konsantrasyonlarında elde edilen sonuçların hassasiyetinin artmasıyla oldu (Joseph Wang, 2008) (Cass vd., 1984) (Clarke & Foster, 2012). Bu dönemde yaygın olarak çalışmalar GOx'in redoks merkezi ve elektrot yüzeyi arasında elektriksel iletişimin kurulmasına doğru yöneldi. Osmiyum redoks bölgeleri ile esnek bir polimeri kullanmaya başlayan Heller'in çalışması özellikle dikkat çekicidir (Degani & Heller, 1987) (Bartlett, Booth, Caruana, Kilburn, & Santamaría, 1997). Tablo 1.2'de sensörlerin kronolojik geliş süreçleri gösterilmiştir.

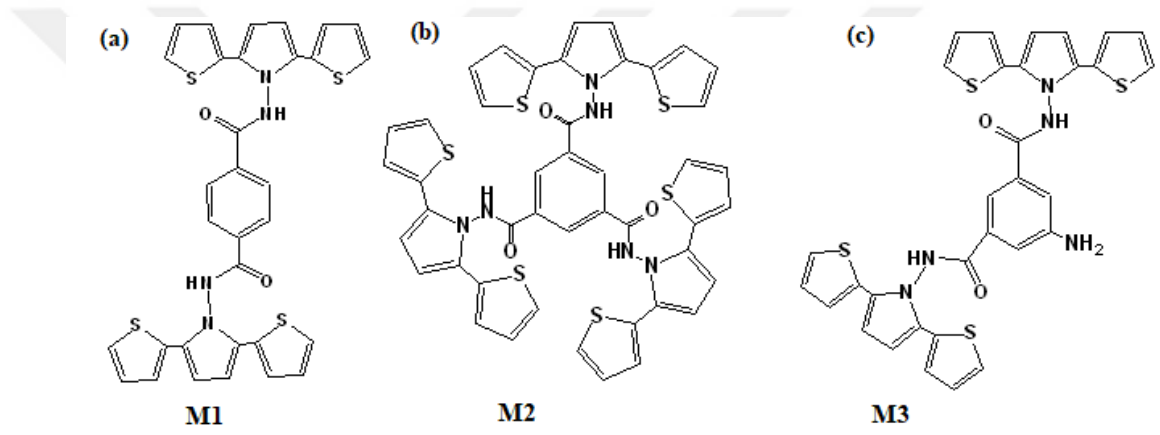
Tablo 1.2 Biyosensörlerin kronolojik gelişimi

Tarih	Gelişme
1916	Protein immobilizasyonu ile ilgili ilk bildiri: Aktif kömür üzerinde invertaz enziminin adsorpsiyonu
1922	İlk cam pH elektrotu
1956	Oksijen elektrotunun bulunması
1962	Biyosensörün ilk kez tanımlanması: Glikoz için amperometrik enzim elektrotu
1969	İlk potansiyometrik biyosensör: Üre tespiti için bir ammonia elektrotu üzerine üreaz immobilizasyonu
1970	İyon-seçici alan etkili transistörün (ISFET) icadı
1972–75	İlk ticari biyosensör: Yellow Springs Instruments glikoz biyosensörü
1975	İlk mikrop-bazlı biyosensör İlk immün sensörü: platin bir tel üzerinde yumurta albümini pO_2/pCO_2 optik sensörünün bulunması
1976	İlk başucu yapay pankreas (Miles)
1980	İn vivo (canlı içi) kan gazı için ilk fiber optik pH sensörü
1982	Glikoz için ilk fiber optik temelli biyosensör
1983	İlk yüzey plasmon rezonans (SPR) immün sensörü
1984	İlk mediyatörlü amperometrik biyosensör: Glikoz deteksiyonu için glikoz oksidaz ile ferrosen kullanıldı
1987	MediSense ExacTech glikoz biyosensörünün piyasaya sürülmesi
1990	Pharmacia BIACore SPR-temelli biyosensör sisteminin piyasaya sürülmesi
1992	i-STAT elde taşınabilen kan analizleyicisini piyasaya sürdü
1996	Glucocard piyasaya sürüldü
1996	MediSense'in kazancı yaklaşık \$867 milyon oldu
1998	LifeScan FastTake kan glikoz biyosensörü piyasaya sürüldü
1998	Roche ve Boehringer Mannheim'in Roche Diagnostics'i oluşturmak için birleşmesi
2001	LifeScan glikoz test etme ticareti için \$1,3 milyara Inverness Medical'i satın aldı
2003	i-STAT yaklaşık \$392 milyon kazandı
2004	Abbott \$1,2 milyara Therasense'i satın aldı

Ticarileşmiş glikoz biyosensör sistemleri küçük, tek kullanımlık, glikoza duyarlı bir elektrottan oluşur ve bu portatif cihaz entegre bir elektronik devreden ve LCD bir ekrandan meydana gelir. Son yıllarda tutuklama teknikleri yüksek sinyal yoğunluğu, hızlı elektron transferinin kolaylaştırılması ve enzimin direkt elektrota bağlanması için geliştirilmektedir. Glikoz sensör sistemlerinin Ar-Ge çalışmaları ve geliştirilmesi için ayrılan bütçe bu cihazların ticari hacminin çok büyük olması sebebiyle her geçen gün artmaktadır (Setford & Newman, 2005).

1.3 Çalışmanın Amacı

Bu tezde kitosan ile üç farklı elektroaktif monomerlerden sentezlenen polimerlerin yeni bir yöntem ile kompozitlerinin oluşturulması ve üretilen bu kompozitlerin elektrokimyasal, spektroeletrokimyasal, elektrokromik ve biyosensör özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç çerçevesinde daha önce Soğancı (Soğancı, 2017) tarafından sentezlenen üç tip konjuge 2,5-di(2-tiyenil)pirol (SNS) türevi monomer kullanılmıştır (Şekil 1.1 (a), (b), (c)). Bu monomerler üstün optik ve elektriksel özelliklere sahip ağ yapılı iletken polimer oluşturmaları yanında benzer yapılı monomerlere göre daha düşük onset potansiyeline sahiptir.



Şekil 1.1 (a) N^1,N^4 -bis(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)tereftalamid (M1), (b) N^1,N^3,N^5 -tris(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)benzen-1,3,5-trikarboksamid (M2), (c) 5-amino- N^1,N^3 -bis(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)isofthalamid (M3)

Kitosan ve iletken polimerlerle hazırlanan kompozitler ilk olarak ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde sentezlenerek indirgenme ve yükseltgenme davranışları, elektrokromik ve spektroeletrokimyasal özelliklerinin araştırılmıştır.

İkinci aşamada ise benzer yöntemle kitosan ve iletken polimerler kompozitleri grafit elektrot yüzeyinde sentezlenerek biyosensör platformları hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensörler karakterize edilerek gerçek uygulamalarda kullanımları araştırılmıştır. Ayrıca planlanan sensör platformları ile mediyatör ve karbon bazlı nano malzemeler kullanılmadan direkt elektron transferi ile glikozun tespiti yapılmıştır.

Kitosan ve iletken polimer malzemelerin kompozitleri her iki elektrot yüzeyinde de literatürde bulunmayan bir yöntemle hazırlanmıştır. İletken polimerler ve kitosanın literatürde çoğunlukla

grafen oksit ve karbon nano tüp gibi karbon temelli malzemelerle kompozitleri oluşturulmuştur (Reza vd., 2015) (Singh vd., 2013) (Liu vd., 2011) .

Kitosan ve iletken polimer birlikte kullanılarak kitosanın biyouyumlu, amin ve karboksil gibi fonksiyonel gruplara sahip ve mükemmel film oluşturabilme gibi karakteristik özelliklerini iletken polimerlerin iyi elektriksel iletkenliği, yüksek stabilitesi gibi özelliklerini birleştirerek yeni ve çok fonksiyonlu malzemeler tasarlanması ve üretilmesi amaçlanmış ve deneyler bu amaçlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Özellikle ITO elektrot yüzeyinde önce kitosan ile ince bir film oluşturulup ardından elektrokimyasal yolla elektroaktif bir monomerin elektropolimerizasyonu kitosanın yalıtkan karakterinden dolayı bu çalışmaya kadar düşünülmemiştir. Fakat kitosan kaplı yüzeydeki iyonik iletkenlik yardımıyla hedeflenen kompozitler hem ITO elektrot yüzeyinde hem de grafit elektrot yüzeyinde oluşturularak karakterize edilmiştir. Her iki elektrot yüzeyinde oluşturulan kompozit yapılar biyosensör ve elektrokromik uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılmıştır.. Tablo 1.3'te bu tez kapsamında hedeflenen ve gerçekleştirilen çalışmalar özetle gösterilmiştir.

Tablo 1.3 Bu çalışma kapsamında hedeflenen ve yapılan çalışmalar

Malzeme	Uygulama	Hedef	Elektrot	Karakterizasyon
CH-P(M1) CH-P(M2) CH-P(M3)	Elektrokromizm	Redoks davranışları, Stabilite, Optik özellikler	ITO	Dönüşümlü Voltametri Spektroelektrokimya Kinetik SEM ile yüzey karakterizasyonu
CH-P(M1)-GOx CH-P(M2)-GOx CH-P(M3)-GOx	Biyosensör	Başarılı sensör platformu	Grafit	Optimizasyon Seçicilik Stabilite Gerçek örnek Uygulamaları SEM ile yüzey karakterizasyonu

2 ELEKTROKİMYA VE ELEKTROKROMİZM

2.1 Elektrokimyanın Temelleri

Elektrokimya elektrot ve çözelti arasındaki ara yüzeyde elektriksel niceliklerin kimyasal parametreler ile ilişkilendirilmesi hususunda kimya ve elektrik arasında bir köprüdür (Joseph Wang, 2000). Bu bilimin anlaşılması İngiliz fizikçi ve bilim adamı William Gilbert' in elektriksel maddelere kısaca değindiği 'De Magnete' ('The Magnet') isimli kitabının yayınlandığı 16. Yüzyılda başlar. Bununla birlikte 19. Yüzyılda iki kimyacı William Nicholson ve Johann Wilhelm Ritter elektroliz tekniğini kullanarak suyu hidrojen ve oksijene ayırdı ve böylece elektrokimya kimyanın bağımsız bir bilim dalı oldu. Günümüzde elektrokimya yenilenebilir enerji, metal saflaştırılması ve biyomedikal analiz içeren birçok uygulamada kullanılan gelişen disiplindir (Joseph Wang, 2000).

2.1.1 Faraday Akımı

Faraday akımı elektrot yüzeyinde meydana gelen, elektroaktif türlerin oksidasyonu sırasındaki değişime bağlı olarak üretilen, elektrokimyasal bir hücre vasıtasıyla akan ve çözeltideki analit ve destek elektrolit arasındaki yük transferinin akıma sağladığı katkıyla birleştirilen akımdır. Faraday akımı Faraday yasasına uyar.

2.1.2 Kütle Transferi

Kütle transferi üç biçimde gerçekleşir. Birincisi konsantrasyon farkına bağlı olarak parçacıkların kendiliğinden konsantrasyonun az olduğu tarafa hareketi olan difüzyondur. Parçacıklar konsantrasyon eşitlenene kadar yüksek konsantrasyona sahip olan bölgen düşük konsantrasyonlu bölgeye akarlar. Parçacıkların çözeltinin karıştırılması veya akıtılması ya da elektrotun döndürülmesi veya titretilmesi gibi dışarıdan uygulanan bir mekanik enerji vasıtasıyla hareket ettirildiği ikinci kütle transfer metodu konveksiyon ile iletimdir. Üçüncü yol ise bir elektrik alan boyunca yüklü parçacıkların hareket ettirilmesidir. Kütle transfer olayı birim zamanda bir yüzey alanı boyunca akan moleküllerin oranı olarak tanımlanan akı (J)

tarafından ifade edilir. Bir sistemde yukarıda belirtilen üç kütle transfer olayı gerçekleşirse bu Nernst – Planck (denklem 2.1) eşitliği kullanılarak hesaplanabilir.

$$J(x, t) = -\frac{D\partial C(x, t)}{\partial x} - \frac{zDFC}{RT} \frac{\partial \phi(x, t)}{\partial x} + C(x, t)V(x, t) \quad (2.1)$$

Burada D difüzyon sabiti [m^2s^{-1}], yığın derişimi [M], z elektroaktif türlerin iyon yükü, ϕ potansiyel ve V hidrodinamik hızdır. Çoğunlukla elektrokimyasal ölçümlerde potansiyel gradyenti destek elektrolitinin fazla olması sağlanarak minimum düzeyde tutulur ve buna bağlı ifade ihmal edilebilir. Bu deneyler çoğunlukla konveksiyonla taşınım olmadan gerçekleştiği için denklemdaki ilgili kısım ihmal edilebilir (Joseph Wang, 2000). Buna göre akı konsantrasyon değişimine bağlı olur ve aşağıda denklem 2.2’de gösterildiği gibi ifade edilir.

$$J(x, t) = -D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} \quad (2.2)$$

Akım denklem 1.3’de gösterildiği gibi direk difüzyon akısı ile doğru orantılı olduğundan:

$$i = -nFAJ \quad (2.3)$$

Elektrokimyasal bir sistemde akım cevabı aşağıda gösterildiği gibidir.

$$i = nFAD \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} \quad (2.4)$$

denklem 2.4’de görüldüğü gibi akım elektroaktif türün konsantrasyon değişimiyle doğru orantılıdır. Bu yaklaşımlar elektrokimyasal bir sistemi diğerlerine nazaran basit bir model yapar. Elektrokimya daha karmaşık sistemlerde çalışmak için geniş bir teknik yelpazesi sunar.

2.2 Elektroanalitik Teknikler

Elektrokimyasal teknikler bu tezin temelini oluşturmaktadırlar. Gerek polimer sentezi ve karakterizasyonu gerekse biyosensör deneyleri bu teknik kullanılarak yapılmıştır. Amperometri, kronoamperometri, dönüşümlü voltametri ve hidrodinamik voltametri gibi birçok teknik vardır.

İletken polimerin elektropolimerizasyonu ve iletken kompozitin elektrokimyasal özellikleri dönüşümlü voltametri tekniği ile araştırılmıştır. Biyosensör çalışmalarında ise amperometrik yöntem kullanılmıştır.

2.2.1 Karışan Çözelti Tekniği

Konveksiyon ile kütle transferini kullanan elektrokimyasal teknikler Fick'in difüzyon kanununa uyarlar. Fick kanunu difüzyon akısı (J) difüzyon sabiti (D) ve konsantrasyon gradyentine (C(x)) bağlı olarak denklem 2.5'de gösterilmiştir.

$$J_{(x,t)} = -D \frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \quad (2.5)$$

2.2.1.1 Nernst Difüzyon Tabakası

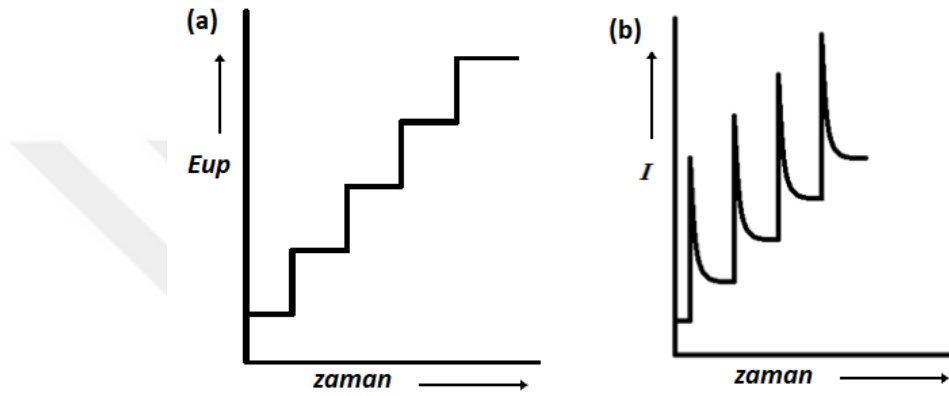
Nernst difüzyon tabakası (δ) adı verilen durgun çözeltinin ince bir tabakası Elektrot yüzeyinde oluşur. Nernst difüzyon tabakası için verilen denklem aşağıdadır. Burada A elektrot yüzey alanını, n elektron sayısını, D difüzyon tabakası sabitini C_B ise çözeltideki konsantrasyonu gösterir. Fick kanunundan yola çıkılarak konsantrasyon gradyenti ve difüzyon akısı δ arasındaki ilişki ifade edilir. Buna bağlı olarak akımdaki her artış çözeltinin (C_s) konsantrasyonuna bağlıdır (Kuwana, 1983). Nernst difüzyon tabakası karıştırma oranı belli olduğunda sabit kalır. Optimum uygulama potansiyeli sınır akıma ulaşıldığı yerdeki potansiyel olarak kabul edilir ve hassasiyette buna ilaveten bir artış olmaz. Bu optimum potansiyelde akım, denklem 2.6 ye göre, elektrot yüzeyine elektroaktif türlerin difüzyonu tarafından sınırlanır.

$$i_{LIM} = \frac{nFADC_B}{\delta} \quad (2.6)$$

2.2.1.2 Hidrodinamik Voltametri

Hidrodinamik teknikler hareketsiz sabit potansiyelde maksimum hassasiyete ulaşarak optimum uygulama potansiyeli E_{up} 'i belirlemek için kullanılır. Hidrodinamik voltametri (HDV)

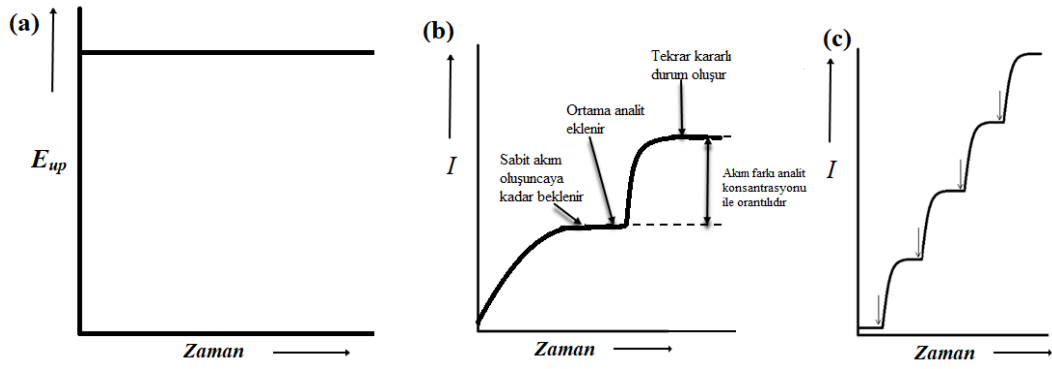
çözeltinin karıştırılması ya da elektrotun titretilmesi veya döndürülmesi ile yapılan konveksiyonla kütle transferi ile kontrol edilen bir yöntemdir. Karıştırılan çözeltide amperometri en yaygın kullanılan HDV tekniğidir. Çözelti karıştırılır ve E_{up} Şekil 2.1(a)'da görüldüğü gibi artarda basamaklar şeklinde bir akım platosuna ulaşıncaya kadar artar (Şekil 2.1(b)). Her E_{up} artışından sonra ulaşılan kararlı durum limit akımını ($i_{LİM}$) saptamak için grafiğe geçirilir ve bundan dolayı optimum uygulama potansiyeli amperometrik saptamalar için kullanılır (Kuwana, 1983).



Şekil 2.1 (a) Tipik elektrot potansiyel artışı, (b) Potansiyel artışına karşılık gelen akım çıktısı

2.2.1.3 Amperometri

Sabit bir potansiyel kararlı durum akımı oluşuncaya kadar referans elektrotuna karşı bir çalışma elektrotuna uygulanır (Şekil 2.2 (a)). Bu karıştırılan bir çözeltide etkin kütle transferinden dolayı çok daha kolay gerçekleşir. Karıştırma işlemi çalışma elektrotunda konsantrasyon gradyentinin sabit kalmasını sağlar. Şekil 2.2(b)'de görüldüğü gibi öncelikle akımın zamanla kararlı hale ulaşması beklenmelidir ardından istenen analitin belli bir miktarı voltametik hücreye eklenmelidir. Bu eklemenin ardından bir akım artışı olur. Akım artışının büyüklüğü, çalışma elektrotu yüzeyinde meydana gelen redoks reaksiyonunun hızıyla bağlantılı olarak, analitin konsantrasyonuyla orantılıdır. Diğer eklemelerde kararlı duruma ulaşıldıktan sonra yapılmalıdır (Şekil 2.2(c)).



Şekil 2.2(a) Amperometrik deneylerde potansiyel zaman arasındaki ilişki, (b) Amperometrik testlerde analit eklenmeden ve eklendikten sonra akımda meydana gelen değişim (c) Art arda analit eklenmesi ile tipik bir amperometrik hücrenin grafiği

2.2.2 Durgun Çözelti Teknikleri

Karıştırılmayan çözeltilerde difüzyon tabakası (δ) belirlenmiştir. Üretilen akımın büyüklüğü zamanla konsantrasyon değişim hızını belirleyen Fick'in ikinci yasasına (denklem 2.7) göre belirlenir.

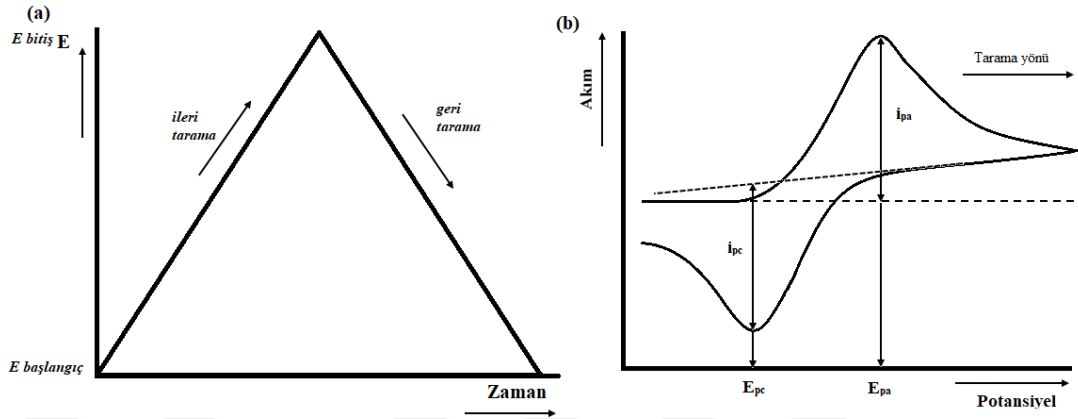
$$\frac{dc}{dt} = D \left(\frac{d^2C}{dx^2} \right) \quad (2.7)$$

2.2.2.1 Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü Voltametri (Cyclic voltammetry-CV) redoks sistemleri, reaksiyonun dönüşümlülüğünü, sistemin stokiyometrisini ve analitin difüzyon sabitini araştırmak için yaygın olarak kullanılan çok yönlü potansiyodinamik elektroanalitik bir tekniktir. Bunlar bilinmeyen bir bileşenin elektrokimyasal karakterini ve kimliğini saptamak için kullanılabilir.

Dönüşümlü voltametri tekniği ile katodik (E_{pc}) ve anodik (E_{pa}) pik potansiyeli, katodik (i_{pc}) ve anodik (i_{pa}) pik akımı gibi önemli parametreler karakterize edilir. Dönüşümlü voltametri doğrusal olarak Şekil 2.3 (a)'da gösterildiği gibi belirlenmiş bir dönüm potansiyeline ulaşınca kadar önceden ayarlanmış bir tarama hızıyla (scan rate) çalışma elektrotuna potansiyel uygulanmasıdır. Dönüm potansiyeline (switching) ulaşıldığında potansiyel aksi yönde değişmeye ve düşmeye başlar. Potansiyeldeki bu değişimler olurken aynı zamanda akımda

meydana gelen değişimler ölçülür. Potansiyel değişimi sonucunda akımda meydana gelen değişiklikler Şekil 2.3(b)'de gösterilen dönüşümlü voltametri grafiği (cyclic voltammogram) olarak bilinir.



Şekil 2.3(a) Dönüşümlü voltametri için girdi dalga şekli **(b)** Tersinir bir redox çifti için tipik dönüşümlü voltametri çıktısı

İki pik akımı (i_{pc}/i_{pa}) ve iki pik potansiyeli (E_{pc}/E_{pa}) dönüşümlü voltametri tekniği ile yapılan analizlerin temelini oluşturur. Voltametri analiz grafiğinin (voltammogram) şekli döngü boyunca elektrot yüzeyinde tepkenin (reactant-R) veya ürünün (product-P) konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır. İdeal olanı taramanın analitin ne indirgendiği ne de yükseltgendiği ihmal edilebilir bir akım geçiş potansiyelinde başlamasıdır. Potansiyel lineer olarak artmaya başladığında çözeltide analit ve elektrot arasında elektron transferi başlar ve bu ürünün birikmesine ve tepkenin tükenmesine sebep olur. Potansiyel artışı Nernst eşitliği (Denklem 2.8) ile açıklanır.

$$E = E^0 \mp \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (2.8)$$

Nernst eşitliği sırasıyla elektrot yüzeyinde yükseltgenen/indirgenen türlerin konsantrasyon oranları, elektrokimyasal hücrenin elektrot veya elektrolit içeren herhangi bir kısmının indirgenme potansiyeli (E^0) ile bağlantılıdır. Burada E elektrokimyasal hücrenin elektrot veya elektrolit içeren herhangi bir kısmının indirgenme potansiyelini (half-cell reduction potential), E^0 standart yarı-hücre potansiyelini gösterir. R ideal gaz sabiti ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T mutlak sıcaklık, n elektron sayısı ve F Faraday sabitidir (birim mol elektron için coulomb sayısı, $9 \times 10^4 \text{ C/mol}$) gösterir.

Tersinir bir sistemde pik akımı (i_p) Randles-Sevcik eşitliği ile tarif edilir (Kissinger & Heineman, 1983). Akım konsantrasyon ile doğru orantılıdır ve tarama hızının (scan rate) kareköküne göre artar (denklem 2.9). Bu tarama hızına bağlılık kütle transferi tarafından kontrol edilen elektrotta reaksiyon meydana geldiğine işaret eder. Reaksiyon normal şartlardaki sıcaklıkta meydana gelir. ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, n = ilgili elektron sayısı, A = elektrot yüzey alanı, D = Difüzyon sabiti, C = asıl elektrolitin konsantrasyonu v = tarama hızı).

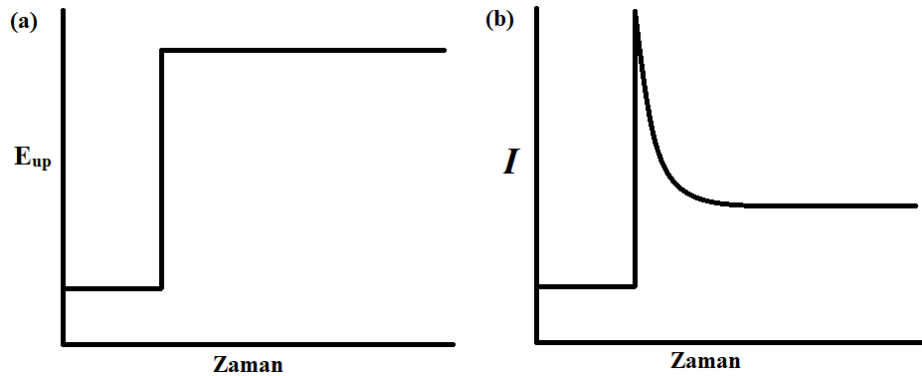
$$i_p = (2,69 * 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2.9)$$

Elektrokimyasal tersinir bir çiftin tersinirliği iki pik potansiyeli potansiyel farkının ölçümü ile belirlenir. Elektrokimyasal tersinir bir sistem denklem 1.6 da ifade edilen **1 elektron** transfer prosesine dayanır. Hızlı 1 elektron transferi 59mV ΔE_p 'dir.

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{59}{n} \text{ mV} \quad (2.10)$$

2.2.2.2 Kronoamperometri (Chronoamperometry)

Kronoamperometri karıştırılmayan durgun bir çözeltide iletken olabilme özelliği ile amperometriden ayrılır. Yeterli bir E_{up} yüzeyde redoks bir reaksiyon sürerken uygulanır (Şekil 2.4(a)) ve bu analiti bozan büyük bir akım üretir bu sırada difüzyondan dolayı elektrot yüzeyinde analit konsantrasyonu azalır (Şekil 2.4(b)).



Şekil 2.4 (a) Uygulanan potansiyelin zamana göre değişimi, (b) Uygulanan potansiyel sonucu akımda meydana gelen değişim.

Düzlemsel bir elektrot için zamanla akımda meydana gelen değişim Fick'in ikinci yasasından türetilen Cottrell eşitliği (denklem 2.11) ile ifade edilir (Bockris, Reddy, & Gamboa-Aldeco, 2000) . Burada n elektron sayısını, F Faraday sabitini, elektrot yüzey alanını (cm^2), C^0 asıl elektrolit konsantrasyonunu (mol/cm^3), t zamanı (saniye) ve D difüzyon katsayısını (cm^2/s) gösterir .

$$i_t = \frac{nFAC^0D^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (2.11)$$

2.3 İletken Polimerler ve Elektrokimyasal Polimerizasyon

2.3.1 İletken Polimerler

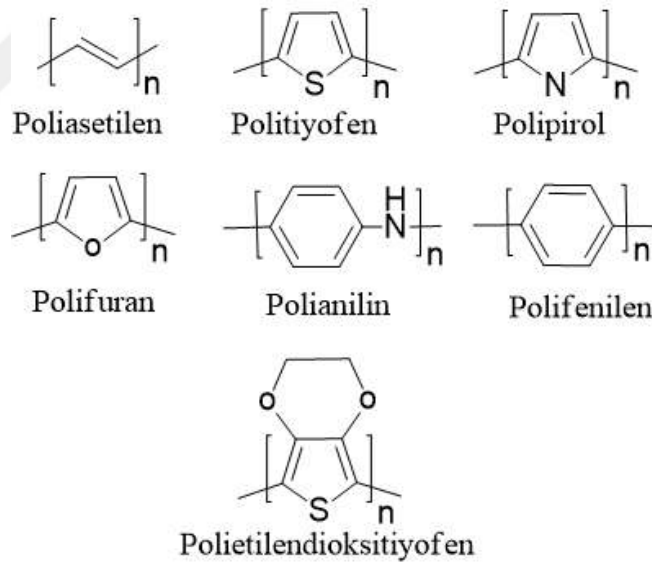
“İletken polimerler” terimi elektriği dağıtabilen veya iletebilen özel polimerler olarak tanımlanmıştır, fakat bu terim gerçekte tamamıyla farklı iki tür polimerleri içerir. Birinci tür polimerler karbon siyahı, metal tabakaları ve metal fiberleri gibi iletken dolgu maddeleri ile birleştirilmiş polimerleri içerirler ve bunlar ticari olarak kullanılan polimerlerin büyük bölümünü oluştururlar. İkinci tür polimerler ise kendiliğinden iletken polimerler (KİP) olup, kimyasal yapıları nedeniyle kendi molekül zincirleri boyunca elektriği dağıtabilen veya iletebilen polimerlerdir. Bu tez kapsamında kullanılan iletken polimerler yapısal olarak elektriği kendiliğinden iletebilen polimerlerdir.

İletken polimerler konusundaki çalışmalar 1950’lerde başlamıştır. İletkenlikleri oda sıcaklığında 10^{-5} S/cm olan yarı iletken polimerler 1950-1960 yılları arasında üretilmiştir. Günümüzdeki anlayışa uygun iletken polimerler 1970’lerin sonunda ortaya çıkmaya başlamıştır. Bağ elektronları lokalize olarak kalırlar ve elektriği iletmezler. Ancak polimerin iyot gibi güçlü bir elektron alıcısıyla dop edilmesi (katkılanması) sonucunda polimer malzeme bir metal gibi elektriği iletmeye başlar. Hatta bu iletkenlik poliasetilende saf poliasetilene (PA) göre 10^{11} kere daha fazladır (Shirakawa vd., 1977).

İletken bir polimerin temel özelliği polimerin omurgası (ana zincir) boyunca konjuge (ardışık sıralanmış) çift bağların olmasıdır. Polimerlerin elektronik iletkenliği ana zincirde bulunan konjuge çift bağlar yardımıyla olur. Elektronlar zincir üzerinde bu konjuge çift bağlar

yardımla taşınırlar. İletken polimerleri diğer polimerlerden ayıran temel husus iletken polimer zinciri üzerinde tek ve çift bağların ardışık bir biçimde dizilmiş olmasıdır. Bu ardışık bağ dizilişine konjugasyon adı verilir ve bu yapıya sahip polimerlere konjuge polimer adı verilir. Konjugasyon, polimer maddeyi iletken yapmak için yeterli değildir. Fakat bunlara dopant adı verilen maddeler girilerek iletkenliği artırılabilir. Dopantlar malzeme içerisinde elektron ve “hole” lerin sayısını arttırmaktır. Bir elektron eksikliğinin olduğu konuma bir hole denir. Böyle bir “hole” komşu bir konumdan atlayan bir elektronla doldurulduğunda yeni bir hole oluşturulur ve bunun böyle devam etmesiyle yükün uzun bir mesafeye göç etmesi sağlanır.

Kendiliğinden iletken polimer malzemeler keşfedilmesinden günümüze kullanımları artmış ve gelişimleri devam etmiştir. Polianilinler, polipiroler ve politiyofenler çevresel kararlılıklarından ve yapısal çeşitliliklerinden dolayı en çok dikkat çeken iletken polimerlerdir (Groenendaal vd., 2000). Bu polimerlerin elektronik ve elektrokimyasal özellikleri monomer yapısının modifiye edilmesiyle geliştirilebilir. Ayrıca ticari olarak mevcut olanların kimyasal yapıları Şekil 2.5 ‘de gösterilmiştir.

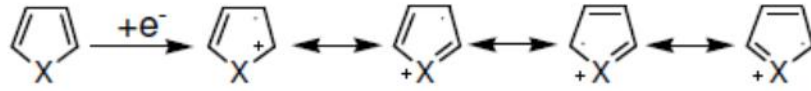


Şekil 2.5 Literatürde ve ticari olarak bulunan bazı iletken polimerin kimyasal yapıları (Soğancı, 2017)

2.3.2 Elektrokimyasal Polimerizasyon

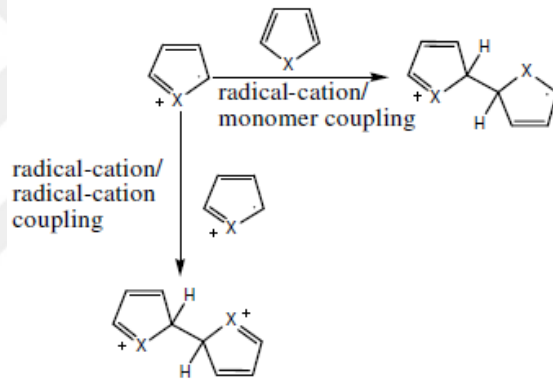
Elektrokimyasal yöntem, iletken polimer sentezinde eskiden beri bilinen bir yöntem olup, değişik tekniklerle beraber günümüzde de sıkça uygulanmaktadır. Polimer bir filmi istenen

kalınlıkta üretimde elektrokimyasal Polimerizasyon oldukça pratik bir tekniktir. Farklı rezonanslarda elektrokimyasal oksidasyon pirol, tiyofen, anilin, furan vb. elektriksel iletken polimer (CP) ürünleri stabilize eder (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 X= N-H, S, O olduğunda radikal-katyonun oluşumu hususunda beş elemanlı heterocyclic bileşenin rezonans stabilizasyonu

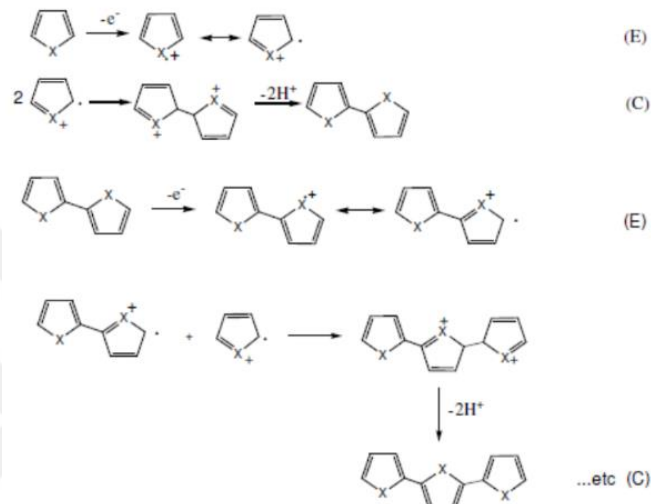
Polimerizasyon ya radikal-katyon/radikal –katyon eşleşmesini yada nötr bir monomer ile bir radikal katyonun reaksiyonu ile gerçekleşir (Şekil 2.7) (Diaz, Martinez, Kanazawa, & Salmón, 1981) (Mortimer, Dyer, & Reynolds, 2006).



Şekil 2.7 X= N-H, S, O olduğunda radikal-katyon/monomer ve radikal-katyon/radikal-katyon eşleşmesi

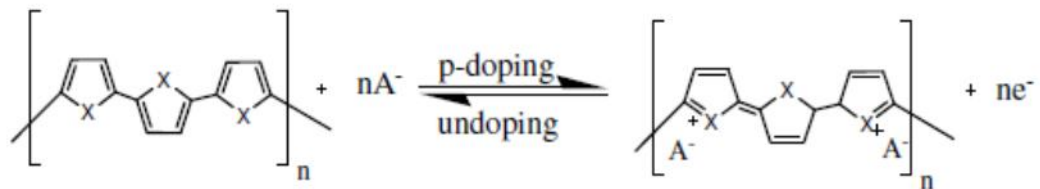
Bu metotta, monomer uygun bir çözücü veya destek elektrolitle beraber polimerleşme hücrelerine konularak yapılan elektroliz sonucunda, elektrot yüzeyinde veya çözeltide polimer elde edilebilmektedir. Polimerleşme hücresi genellikle, çalışma, karşı ve referans elektrottan oluşan üç elektrotlu bir sistemdir. Hücre içine konulan sulu veya susuz ortamdaki monomer çözeltinin, dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile uygun bir voltaqramı alınarak sabit akım veya sabit potansiyelde polimerleşme gerçekleştirilmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, monomerin yükseltgenme veya indirgenme potansiyelinde çözücü olarak, destek elektrolit ve elektronların reaksiyon vermemesidir. Monomerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşan radikal anyon veya radikal katyon zinciri büyümekte ve bunlar da iletken polimer zincirleri oluşturmaktadır. Elektrokimyasal polimerleşmede kontrollü potansiyel veya akım uygulaması (sabit potansiyel ve sabit akım elektroliz), başlangıcı ve bitiş basamaklarının

kontrol edilebilmesi gibi üstünlükleri vardır. Bu yüzden kimyasal yöntemle daha saf, yan ürünlerden ve kirlilikten arınmış ürünler elde etmek mümkündür (Metin & Et Al., 2007). Elektropolimerizasyon genel bir ECE(E: Elektrokimyasal, C:Kimyasal) şemasına göre (Şekil 2.8) artarda elektrokimyasal ve kimyasal adımlardan (oligomerler elektrolit çözeltisinde çözünmez oluncaya ve elektrot yüzeyine çökünceye kadar) dolayı avantajlıdır (Ak, Camurlu, vd., 2006).



Şekil 2.8 ECE Mekanizması

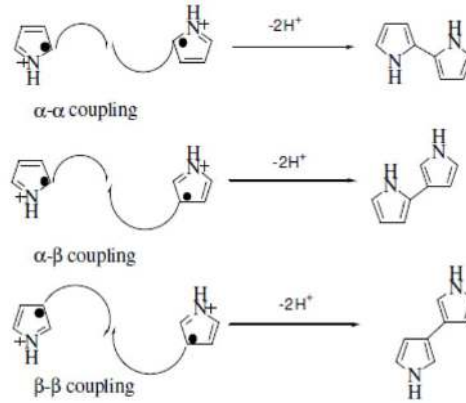
Polimer oksidasyon elektrodpozisyonla eş zamanlı olur. Çünkü konjuge oligomerler onlara ilişkin monomerden daha düşük potansiyelde yükseltgenir. Yükseltgenme durumunda iletken polimerler p-tip doptur ve π - band yapısı delokalize olur, Zincirlerde yük karşı anyonlarla ayarlanır. Redüksiyondan sonra karşı anyonlar ayrılır veya elektrolit katyonları girer. Elektronik konjugasyon uzaklaştırılır ve polimer yalıtkan formdadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 İletken bir polimerde undoping, p-doping

Oksidatif çiftleşmenin heterocyclic halka üzerindeki bölgede (yüksek bir spin yoğunluğunun radikal katyon için bulunduğu yerde) yer aldığına dair bir düşünce vardır. Tiyofen, pirol ve furan için en yüksek spin yoğunluğu 2 ve 5 pozisyonlarında ölçülmüştür, ayrıca α pozisyonları olarak anılırlar (Söyleyici, Ak, Şahin, Demikol, & Timur, 2013) (Kurtay, Ak, Güllü, Toppare,

& Ak, 2014). 3 ve 4 pozisyonunun (β pozisyonu olarak isimlendirilir) spin yoğunluğu da ölçülebilir, bundan dolayı bazı eşleşme reaksiyonları bu pozisyonlarda vuku bulur. Piyolün elektrokimyasal polimerizasyonu için farklı eşleşme (coupling) durumları Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Ayrıca, genellikle α - β ve β - β eşleşmeleri düzenli olmayan ana zincirler ve zayıf elektronik özellikler getirir. Çeşitli alkil ve alkoksi gruplarının girişi bu zincir kusurlarında elimine edilebilir.



Şekil 2.10 Oksidatif Polimerizasyon sürecinde piyolün eşleşme reaksiyonları

Elektrokimyasal sentez kolay, seçici ve tekrarlanabilir bir metottur ve bir elektrot üzerinde üretilen malzemenin avantajı vardır. Ayrıca bu metot depozisyon yükü tarafından film kalınlığının kolayca kontrolüne izin verir. Anodik eşleşme proton eliminasyonu ile aynı anda bir polimerin içine monomerin yükseltgenmesinden oluşur (Baran vd., 2010) (Camurlu, Gültekin, & Gürbulak, 2013). Anodik eşleşme tercih edilir çünkü modifiye edilmemiş monomer ve sonuçta meydana gelmiş polimer kullanır, daha kolay yükseltgenir (dop edilir), iletken durumda üretilir ve bundan dolayı istenen kalınlığa kadar malzemenin sürekli depozisyonuna izin verir. Çözücü tipi, elektrolit sistemi, monomer seçimi ve konsantrasyonu ve elektrotlar sonuçta elde edilen iletken polimerin özelliklerini önemli ölçüde etkiler (Ayrancı, Sogancı, vd., 2015) (Skotheim, Elsenbaumer, & Reynolds, 1999).

2.3.2.1 Elektrolitik Ortamın Etkisi

Elektrokimyasal Polimerizasyon reaksiyonunda çözücü ve elektrolit seçimi gereklidir. Elektrokimyasal polimerizasyonda kullanılan çözücü yeterince yüksek dielektrik sabitine böylece ortamın iyonik iletkenliği tamamlanır. Çözücü destekleyici elektroliti dağıtmalı ve

ayrıştırılmalıdır. Nitriller yüksek bir dielektrik sabitiyle yükseltgemedi ve indirgemedi geniş çeşitlilikten dolayı tercih edilir (ACN için $\epsilon=37$) (de León, Campbell, Smith, & Walsh, 2008).

Elektrolitin seçim kriteri çözünürlük, ayrılma derecesi ve nükleofillidir. Kullanılan elektrolitin tabiatının son filmin morfolojisine önemli düzeyde etki eder. Elektrokimyasal polimerizasyonda kullanılan destek elektrolit iki amaçla hizmet eder (Ak, Tanyeli, Akhmedov, & Toppare, 2008) (Soganci, Soyleyici, Soyleyici, & Ak, 2017) :

- a) Elektrolit çözeltisini iletken yapar.
- b) Sentez sırasında oluşan radikal katyon (polaron) ve bikatyonları (bipolaron) stabilize ederek polimeri doplar.

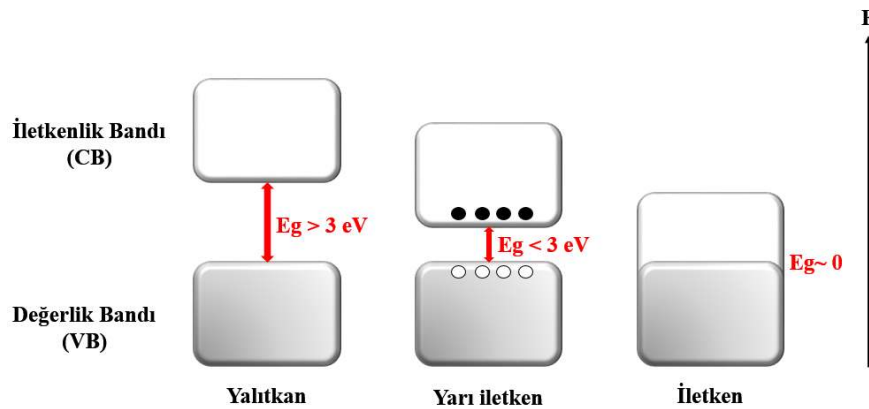
Perkloratların, tetraflorboratların ve heksaflorfosfatların tuzları iletken polimerlerin sentezi için destekleyici elektrolitler olarak yaygın biçimde kullanılır. İnert malzemeler platin, altın, karbon elektrotlar ve indium kalay oksit (ITO) çalışma elektrotu olarak elektrokimyasal polimerizasyonda kullanılırlar. Doymuş kalomel elektrotu (SCE), Ag/Ag^+ ve Ag/AgCl elektrotları referans elektrotları olarak kullanılabilirler (Komorsky-Lovrić, 2010a)

2.3.3 İletken Polimerlerde İletkenlik Mekanizması

Konjuge çift bağ yapısına sahip polimerlerde elektronik uyarma halkanın relaksasyonuna sebep olmaktadır. Polimerlerde iki tür yapısal relaksasyon olduğu kabul edilmektedir. Birincisi polimer zinciri boyunca oluşan tek düze relaksasyon, ikincisi ise lokal olarak yapısal deformasyona neden olan relaksasyondur. Bunların sonucunda polimer zinciri üzerinde serbest radikal (soliton) olarak isimlendirilen farklı spin yük konfigürasyonuna sahip hata merkezleri oluşturabilmektedir (Selçuk, 2010). Poliasetilen ve diğer konjuge polimerlerde katkılama ile polaronik hatalar oluşur ve polaronun elektronik enerji düzeyleri yasak enerji aralığında simetrik olarak iletkenlik ve değerlik bandına yakın konumlarda bulunur. Katkı maddesinin fazla eklenmesi durumunda veya elektrokimyasal olarak katkılama miktarının dolayısıyla polaronların derişimi daha da arttırılırsa polaronlar kendi aralarında etkileşerek bipolaronları oluşturular. Soliton türü hataların sadece zincir boyunca aktarımının mümkün olmasına karşılık bipolaronik hataların bir zincir üzerinden diğerine atlayabilecekleri belirtilmiştir. Sonuç olarak katkılama ile yasak enerji aralığındaki enerji düzeylerine yerleşen soliton, polaron, ve bipolaron gibi yapılar polimerlere iletkenlik kazandırmaktadır (Ayranci, Ak, Ocal, & Karakus, 2016)..

2.3.3.1 Band Teorisi

Değerlik bandı ve iletkenlik bandı arasındaki aralığa band eşiği veya band aralığı, bu aralığın geçilmesi için gerekli enerjiye ise band eşik enerjisi adı verilir. Maddelerin yalıtkan, yarı iletken, iletken şeklinde elektriksel iletkenlikleri açısından gruplandırılmasında band eşik enerjisinin büyüklüğü önemlidir. Polienler gibi π -elektron malzemeler sp^2 hibritleşen bağ ve antibağ π orbitallerinin tamamen dolu π bandını ve boş π^* enerji bandlarını oluştururlar (Selçuk, 2010). Band gap teorisine göre iletken polimerler iki farklı enerji bandı oluştururlar; en yüksek dolu enerji düzeyi değerlik bandı (VB) oluşturur ve en düşük dolu olmayan iletkenlik bandını (conduction band, CB) oluşturur. Değerlik bandı ile iletim bandı arasındaki fark veya band aralığı (E_g), malzemenin kendi elektriksel özellikleri ile belirlenir. Halka uzunluğu, birbirini izleyen bağların uzunluğu, düzlemsellik, elektron akseptör veya donör substituentlerinin varlığı ve aromatik halkaların rezonans stabilizasyon enerjisi gibi çeşitli yapısal yönler lineer π -konjuge sistemin HUMO-LUMO aralığını etkiler (Wiley, 2002). Band aralığı nötral konjuge polimerlerde π - π^* geçişinin başlangıç enerjisine tekabül eder. Bir polimerin band aralığı UV-VIS spektrumunda π - π^* geçişinin absorpsiyonunun başlangıcından tahmin edilebilir. Elektronlar verilen bir bandı doldurmak için kesinlikle enerjiye sahip olması gerekir. Diğer taraftan bandlar elektriksel olarak iletken olabilmesi için kısmi olarak doldurulmalıdır. Çünkü ne boş bandlar nede dolu olanlar elektriği taşıyabilir (Somania & Radhakrishnanb, 2002).



Şekil 2.11 İletken, yarı iletken ve yalıtkanlara ait bant boşluğu teorisi

Konjuge polimerler daha yakın band aralığına sahiptirler ve doping onların band yapısını değiştirebilir. Bu ya değerlik bandından elektronların alınmasıyla (p doping) yada iletim bandına elektronların eklenmesiyle (n doping) gerçekleşir. Yani dıştan yapılan bir etki neticesinde polimerden elektron olarak ya da vererek serbest elektron oluşturulur. İndirgenler,

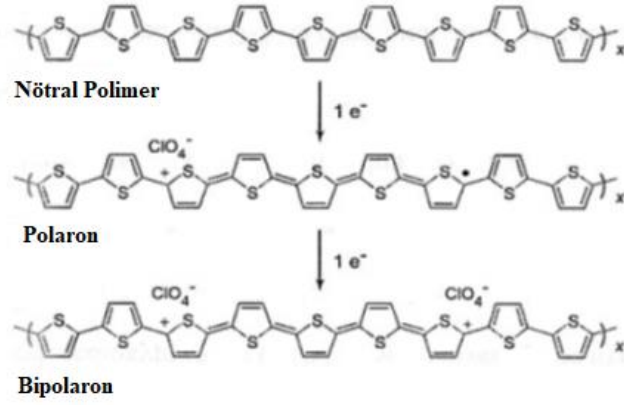
yükseltgenler ya da elektrokimyasal metotlar dış uyaran olarak kullanılabilirler. Doplama ve ya dop etme bu elektron verip alma işleminin adıdır. Bu amaçla kullanılan kimyasallara da dopant adı verilir. Polimer sentezinde kullanılan dopantın türü polimerin iletkenliğini etkiler. Polimerlere elektron verildiğinde bu elektronlar yeni bir enerji düzeyine yerleşirler ve band eşik enerjisini düşürürler.

2.3.3.2 İletken Polimerlerde Katkılama

Doping yapma işlemi, iletken polimerler hazırlamak için konjuge π bağlarına sahip olan bir polimeri uygun bir reaktif ile indirmek veya yükseltmek ile gerçekleştirilir. Polimerler gaz fazında doping, çözelti ortamında doping, elektrokimyasal doping, radyasyon kaynaklı doping, iyon değişimi dopingi gibi tekniklerle doplanabilirler (Raczkowska vd., 2005). Bu tekniklerden ilk üçü daha az maliyetli olduğu için tercih edilmektedir. Gaz fazında doping işleminde, polimerler vakum altında dopantın buharına maruz bırakılır. Çözelti ortamında doping işlemi ise; doping maddesinin çözünebildiği bir çözücünün kullanılması ile gerçekleştirilebilir (Trung, & Ha, 2005).

CP'nin iletkenliği "dopant" denilen basit anyonik ya da katyonik birimler tarafından basit kimyasal veya elektrokimyasal oksidasyon (redüksiyon) yardımıyla gerçekleştirilir. İletim merkezini başlatmak için dopantların polimer ana zincirini indirmesi veya yükseltmesi gerekir ve böylece iletkenlik tamamlanmış olur. Yükseltgenme ve ya indirgenme anyon ve katyonlar yardımıyla gerçekleşir. İzolasyon alanının üzerinden yüksek iletkenlik durumuna (metalik) kadar bir polimerin elektriksel iletkenliğinin kontrolü mümkündür. Bu işlemler doping olarak anılır. Polimerlerde değerlik kabuğundaki elektronlar ya yükseltgen bir reaktif ile koparılabilir ve değerlik kabuğu pozitif hale gelir veya indirgen bir reaktif ile boş iletkenlik bandına bir elektron verilebilir. Bu işlemler, yükseltgenmeye karşılık olmak üzere p-türü doping (Şekil 2.12), indirgenmeye karşılık olmak üzere n-türü doping olarak isimlendirilir (Gurunathan, Murugan, Marimuthu, Mulik, & Amalnerkar, 1999b). Doping işlemi sırasında doping moleküllerinin hiç birisi polimer atomları ile yer değiştirmez, doping molekülleri yalnızca elektronların enerji kabuklarından geçişlerine yardımcı olurlar. Doping yapıcı maddeler veya dopantlar ya güçlü indirgen veya güçlü yükseltgen maddelerdir. Bunlar kolaylıkla iyon oluşturabilen inorganik tuzlar veya bileşikler, nötral moleküller, organik

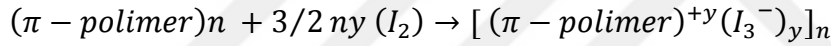
dopantlar ve polimerik dopantlar olabilirler (Randriamahazaka, Noël, Guillerez, & Chevrot, 2005). Dopantların yapısı iletken polimerlerin kararlılığında önemli rol oynar.



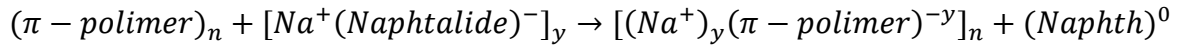
Şekil 2.12 Politiyofenin p-tip dopingi

Kimyasal doping yük-transfer redox kimyasını gerektirir.

a) Oksidasyon (Yükseltgeme, p-tip doping)



b) Redüksiyon (İndirgeme, n-tip doping)

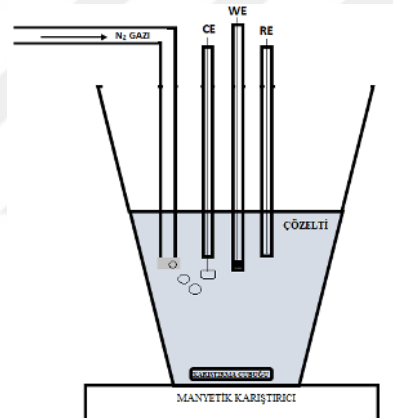


Kimyasal doping etkili ve kolay bir proses olmasına rağmen kontrolü zor olan bir işlemdir. Orta dereceli bir uyarıcı düzeyi elde edilmek istendiğinde homojen olmayan bir doping ile sonuçlanır. Bu problemi çözmek amacıyla elektrokimyasal doping geliştirilmiştir (Nigrey, MacDiarmid, & Heeger, 1979). Elektrokimyasal bir hücrede ayarlanan uygun potansiyel ile polimeri elektrokimyasal olarak yükseltgemek veya indirgemek kolaydır. Polimer zincirinde oluşan yük elektrolit çözeltideki karşıt iyon ile nötürleştirilir.

2.4 Elektrokimyasal Teknikler için Kullanılan Ekipmanlar

2.4.1 Elektrokimyasal Hücre

Tipik elektrokimyasal reaksiyonlar Şekil 2.13’de gösterildiği gibi içine numune çözeltisinin eklendiği, kuvarstan veya camdan yapılmış bir elektrokimyasal hücreden meydana gelir. Numune çözeltisi kullanılan iki ya da üç elektrotu kaplamaya yetecek derinlikte olmalıdır. Sıcaklık gibi değişkenler termostat kontrolünde olan bir su banyosu ile bağlantılı olan bir su ceketini kullanarak kontrol edilebilir. Amperometrik deneylerin karıştırılarak yapılması gerekir bu amaçla manyetik bir çubuk çözeltinin içine konulabilir ve elektrokimyasal hücrenin altındaki manyetik bir karıştırıcı tarafından karıştırma işlemi gerçekleştirilebilir. Karıştırıcının şekli kararlı bir karıştırma işlemi sağlayacak şekilde olmalıdır (Stojek, 2010)



Şekil 2.13 Üç elektrot sistemini temel alan bir voltametrik hücrenin şematik diyagramı. CE: karşıt elektrot (Counter Electrode), WE çalışma elektrotu (Working Electrode), RE: referans elektrot (Reference Electrode).

2.4.2 Çalışma Elektrotu

Çalışma elektrotu (WE) istenen reaksiyonun meydana geldiği yerdir. Çalışma elektrotu karbon gibi deney sırasında kullanılan elektrolit ortamda stabil olan bir malzemeden yapılmalıdır. Malzeme seçimi deney şartlarında elektrotların korozyona uğramaması veya çevresel kirliliklerden etkilenmemesi, bunlara bağlı olarak yüzey alanının değişmemesi ve istenen analitin potansiyel alanını düşüren diğer bileşenlerden korumak için oldukça önemlidir. Çalışma elektrotlarının potansiyel düşüşüne engel olmak için potansiyelin yüzeye eşit bir biçimde dağılması ve bununla birlikte yüzeyinin yeniden üretilebilir olması şartlarını sağlaması

gerekmektedir. İlgili potansiyel bölgesi içindeki arka plan akımı düşük olmalıdır. Malzemenin maliyeti, bulunabilirliği ve toksik olup olmadığı dikkate alınması gereken diğer önemli hususlardır (Komorsky-Lovrić, 2010b).

2.4.3 Referans Elektrotu

Bir referans elektrotu (RE) karşıt elektrot tarafından uygulanan voltajın ölçümü için referans olarak kullanılan, korunan doğru ve sabit bir potansiyele sahip olan bir yarı hücre gibi davranır. Referans elektrotu potansiyometriktir ve bu nedenle içinden geçen akım sıfırdır. Potensiyostat RE ve WE arasında voltaj farkı tespit ettiğinde bunu geri besleme olarak bilinen bir mekanizma ile çıktılar arasındaki fark sıfır oluncaya kadar ayarlama devam ederek farkı ortadan kaldırır (Bagotskiĭ, 2006). Gümüş-gümüş klorür (Ag/AgCl) yaygın olarak kullanılan bir referans elektrotu örneğidir (Joseph Wang, Tian, Nascimento, & Angnes, 1998). Küçük akımların kısa zaman periyotları için geçtiği kronoamperometri gibi uygulamalar için karşıt elektrotun RE ve WE'nin görevin üstlendiği iki elektrotlu sistem kullanılabilir. Referans elektrotun içinden geçen akımdan dolayı zaman içerisinde stabilitesi değişebilir. Bu nedenle bir karşı elektrotunda olduğu üç elektrot sistemi uzun zaman periyotları gerektiren deneysel ve amperometrik uygulamalarda en çok kullanılan yöntemdir (Scholz, 2014).

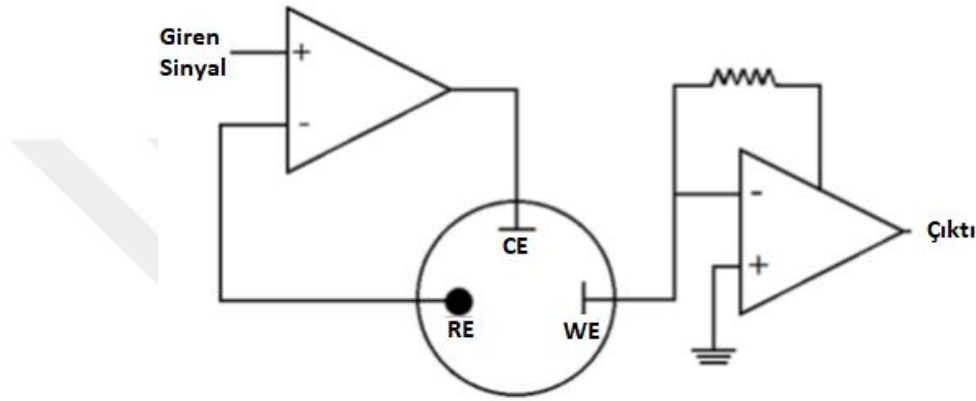
2.4.4 Karşıt Elektrot

Karşıt elektrotun (CE) fonksiyonu WE ye sırasıyla gerilim farkı uygulayarak devreyi tamamlar böylece yük akışını sağlar. CE karbon veya platin gibi inert bir malzemedir (Scholz, 2010)

2.4.5 Potensiyostat

Elektrokimyasal hücre üstünde uygulanan potansiyel farkı kontrol etmek için kullanılan cihaza potensiyostat adı verilir (Şekil 2.14). Bir potensiyostat sabit çalışma elektrotu potansiyelini korumak için anot ve katot arasındaki voltaj farkını ayarlar (Fry, 1989) . Potansiyel çalışma elektrotuna uygulanır ve karşıt elektroda doğru bir yükün akışıyla sonuçlanır. Gerilim düşüşü elektrolit iletkenliğinden, elektrotlar arasındaki mesafeden, akımın ve elektrot malzemesi

boyunca direncin büyüklüğünden kaynaklanır. Eğer potansiyel dengelenmezse reaksiyon istenen potansiyelde uzun süre devam edemez ve hatta durabilir. Referans elektrotu çalışma elektrotundaki potansiyeli izler ve istenen değere geri dönmek için besleme yapar. Eğer potansiyeldeki fark RE ve WE arasında gözlemlenirse CE'ye uygulanan potansiyel bunu dengelemek için değişir. İkinci bir işlem güçlendirici ise akım-voltaj dönüştürücüsü olarak kullanılır ve bu dönüştürücü voltajın birim akım başına çıkışı için kullanılan bir rezistanstır (Kahlert, 2010).



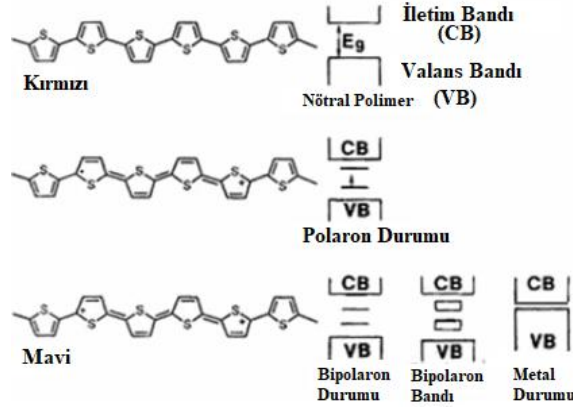
Şekil 2.14 Üç elektrotlu bir potansiyostatın basitleştirilmiş döngü diyagramı.

2.5 Elektrokromizm (Electrochromism)

Elektrokromizm; optik özelliklerdeki tersinebilir değişikliklere denir ve bir malzeme elektrokimyasal olarak indirgendiğinde veya yükseltgendiğinde ortaya çıkar. Bir malzeme farklı renkler gösterebiliyorsa elektrokromik olduğu söylenebilir. Renk değişimi şeffaf durum ile renkli durum arasında veya iki farklı renkli durum arasında gerçekleşir hatta malzeme 2 den fazla redoks bölgesine sahipse birkaç renk birden gösterebilir (Soganci vd., 2017). Elektrokromizm uygulanan bir voltaj altında (görünür bölgede (400-800 nm) ve infrared bölgesi yakınında (NIR)(1000-2000 nm) gibi) bütün elektromanyetik spektrum içerisinde optik özelliklerini değiştirmek için malzemenin kapasitesi olarak tanımlanabilir. Elektrokromik özelliklerin uygulandığı birçok kimyasal tür vardır. Viologenler, geçiş metal oksitleri, çok bilinen tungsten oksit (WO_3) sistemleri, prussian blue sistemleri, ftalosiyaninler ve iletken polimerler yaygın olarak elektrokromik malzeme olarak kullanılırlar (Soganci, Soyleyici, & Ak, 2016).

İletken polimerler inorganik bileşiklere kıyasla hızlı akım verme yeteneği, yüksek renklilik verimi, kimyasal yapı modifikasyonu yardımıyla band boşluğunun ince ayarı ve aynı malzemede çoklu renk elde etme gibi avantajlarından dolayı inorganik malzemelerden daha fazla dikkat çekmektedirler (Ak, Ak, Kurtay, Güllü, & Toppare, 2010). İlk EC (elektrokromik cihaz) yapım çalışmalarında inorganik malzemeler (WO_3 tungsten trioxide, IrO_2 iridyum dioxide gibi) kullanıldı (Işık, Ak, & Durucan, 2009). Fakat inorganik malzemelerle yapılan cihaz tasarımının zor üretimi (cost-intensive production), yüksek maliyeti, yüzeylere yüksek vakum altında uygulanması (cost-intensive sputtering), yavaş yanıt süresi (slow response time) gibi dezavantajları vardır (Yağmur, Ak, & Bayrakçıken, 2013).

Elektrokromizm görünür bölgede kalan π -bağ orbitalleri ve π^* -antibağ orbitalleri arasındaki enerji farkından dolayı meydana gelir. Bu malzemelerin optik özellikleri doping (ve/veya dedoping) kontrol edilerek ayarlanabilir. Doping prosesi (oksidasyon, yükseltgeme) π 'den π^* 'a geçişin yoğunluğundaki azalışla band boşluğunda yeni elektronik durum sunar ve daha düşük enerji geçişinin oluşumu renk değişimine sebep olur (Çilgi, Karakuş, & Ak, 2013). Doping düzeyi artırıldığında; bipolaron, bipolaron bandındaki örtüşme ile ifade edilir, bipolaron bandları iletim ve valens bandlarıyla görünebilir. Band yapısının ve renk değişiminin değerlendirmesi Şekil 2.15'de verilmiştir.



Şekil 2.15 Bozulmamış temel durumda konjuge polimer için p-doping ile elektronik band yapısının değerlendirilmesi

π - π^* geçişi nötral polimerde vuku bulan temel elektronik geçiştir. Nötral durumda renk polimerin band boşluğu (E_g) tarafından saptanır. Polimerin dop edilmiş ve dop edilmemiş şekilleri arasında renk zıtlığı dop edilmemiş polimerin enerji boşluğunun büyüklüğüne bağlıdır. E_g polimerin esas konjugasyon uzunluğu, farklı polimerizasyon yolları ve akım yoğunluğu,

başlangıç molekül yoğunluğu, elektrolitik ortam ve sıcaklık gibi farklı deneysel şartlara bağlıdır (Işık vd., 2009). Eş zamanlı doping-undoping prosesinde, bir kütle transferi film içindeki karşı iyon hareketinden dolayı polimer bulk içerisinde meydana gelir. Bu daha yavaş proses polimer filmin renk değişim kinetiğini kontrol eder(Turaç, Ak, Şahmetlioglu, Kasım Şener, & Kaya, 2012).

Konjuge bir zincirin içine substituentler veren elektronun başlangıcı valens band elektronlarının (konjuge zincirin HOMO'su) enerjisi arttırılarak polimer yükseltgeme potansiyelini azaltmak yaklaşımı yaygın olarak kullanılır. Aynı zamanda, polimerin elektronik band boşluğunda bir azalmaya sebep olan iletim bandının (konjuge zinciri LUMO'su) enerjisi üzerinde küçük bir düzensizlik vardır.

2.5.1 Elektrokromik Malzeme Türleri

Elektronik olarak kabul edilebilen optik durumların isimlendirilmesinde elektrokromik malzemelerin üç ana türüne literatürde değinilmiştir. Birinci tip en az bir derecede renklendiren ve ağartan durumdaki malzemelerden oluşur. Bu malzemeler özellikle akıllı pencereler ve optik panjurlar gibi absorpsiyon/transmisyon-tip devre uygulamaları için kullanışlıdır. Bu alanın tipik örnekleri metal oksitler, viologenler ve poly(ethylenedioxythiophene) (PEDOT) gibi polimerlerdir (Soganci, Kurtay, Ak, & Güllü, 2014) . Malzemelerin ikinci bir sınıfı iki farklı renklenen durum ile elektrokromlardan oluşur. Bu elektrokromik malzemeler iletici bir duruma ihtiyaç duyar, fakat farklı renklerin farklı redox durumları için arzulandığı display tipi uygulamalar için kullanışlıdır. Politiyofen (ince filmleri yükseltgenme ile kırmızıdan maviye değişir) bu türün iyi bir örneğidir (Ak, Durmus, & Toppare, 2007). Üçüncü sınıf ise malzemenin redox haline bağlı olarak iki renkten daha fazla renge ulaşılabilen elektrokromik alana büyüyen bir ilgi vardır (Argun vd., 2004).

Pencere uygulamalarında iletken polimerler daha fazla öne çıkmaktadır. Bir devre iletici ve absorbe edici renk halleri ile bir polimerin kullanımı vasıtasıyla şeffaf ve renkli durumları arasında dönüşebilir. Elektrokromik polimerlerde elde edilebilir renk paleti avantajlı olduğu için, bu malzemeler görüntü teknolojileri için çok daha uygun olur. Elektrokromik malzemeler akıllı pencereler, reklam panoları ve depo devreleri alanlarında kullanımı yaygınlaşmasına rağmen infrared ve mikrodalga bilgesinde, ayrıca telekomünikasyonda anahtar bileşimlerde

(değişebilir optik zayıflatıcı vb) ve devre yapılarında da kullanılmaktadırlar (Ayrancı vd., 2016) (Soganci, Soyleyici, & Ak, 2016) .

2.5.2 Spektroelektrokimya

Spektroelektrokimya doping üzerinden gerçekleşen iletken polimerlerin optik ve elektronik değişimini test eden bir tekniktir. Doping üzerinden oluşan elektronik band boşluğu bandlararası durumlar hakkında bilgi verir.

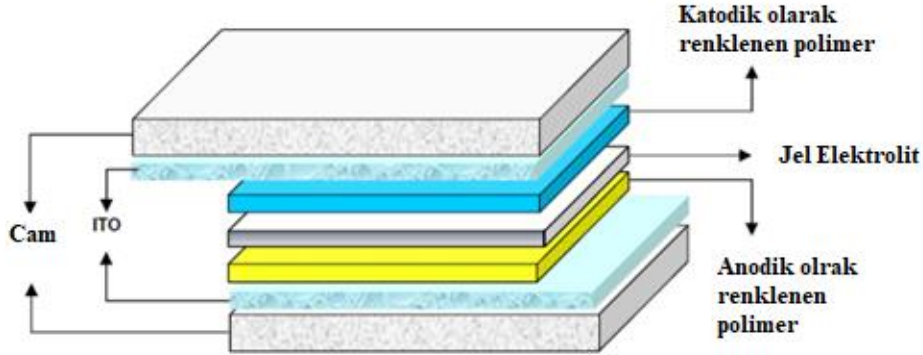
Nötral durumda iletken polimerler valens band (HOMO) ve iletim bandı (LUMO) arasında bir band boşluğu (E_g) ile yalıtan düzendedir. Yükseltgeme veya doping üzerinden polimerin band yapısı modifiye olur, yani bandlar arası geçiş daha az enerji ile gerçekleşir, hem de yük taşıyıcılar (polaronlar ve bipolaronlar) oluşturulur ve sonuç olarak iletkenlik artar. Spektroelektrokimya $\pi-\pi^*$ geçişinin belirlenmesinde, polaronik ve bipolaronik geçişlerde ve bunun yanı sıra band boşluk enerjisinin hesabında kritik öneme sahiptir (Ekiz vd., 2011) .

2.5.3 Elektrokromik devreler (ECD)

Elektrokromik displayler tipik olarak elektrokromik malzemenin ince bir tabakası, transparan katı polimer elektrolitler ve karşı elektrot olarak bir elektrokromik malzeme ile örtülmüş bir elektrot kombinasyonu tarafından yapılandırılır. Eğer karşı elektrodun arkası yansıtıcı bir malzeme ile kaplanırsa, malzeme bir elektrokromik ayna gibi davranacaktır (Tarkuc, Ak, Onurhan, & Toppare, 2008) (Gurunathan vd., 1999b).

Elektrokromik malzemeler ve bataryalar arasında birebir benzerlik vardır. Elektrokromik devreler elektrokimyasal tersinir katot malzemesi(yükseltgenerek renklenen), anot malzemesi (indirgenerek renklenen) ve iyon-iletim elektroliti ile elektromanyetik spektrumda az bir şeffaf elektrottan oluşur. Elektrotlardan biri yükseltgenirken diğeri uygulanan dış potansiyel üzerinden indirgenmeye başlar ve bir filmin nötral renginin ve diğeri filmin yükseltgenen renginin kombinasyonu arasında ve tersine dönüşüme sebep olur (Mortimer, 1999). Elektrolit iletkenliği sadece katot ve anot arasındaki fiziksel ayrılmayı (redoks reaksiyonları ayarlamak için bir katyon ve anyon kaynağı) sağlamamalıdır aynı zamanda spektrumun verilen bölgesinde şeffaf olmalıdır. İyon iletken elektrolit (jel elektrolit) çoğunlukla bir sertleştirici polimer

(PMMA) ile propilen karbonat gibi bir çözücüde çözünmeyen bir inorganik tuzdur (Ak vd., 2007)(Şekil 2.16)



Şekil 2.16 ECD'nin şematik gösterimi

Yüksek performanslı elektro-kromik devre (ECD) için ön koşul yüksek elektro-kromik verim cm^2C^{-1} ile ifade edilir ve renk değiştirmek için malzemede enjekte edilen yüke bağlıdır. Kısa cevap süresi, kararlılık, optik hafıza, açık devre potansiyel şartları altında renk kararlılığı, optik zıtlık, uniform renk dağılımı ise diğer koşullardır.

2.5.4 Elektro-kromik Devrelerin Karakterizasyonu

2.5.4.1 Elektro-kromik Zıtlık ve Dönüşüm Hızı

Optik zıtlık bir elektro-kromik malzemeyi değerlendirmek için gerekli bir parametredir. En yüksek zıtlığın gözlemlendiği spesifik bir dalga boyunda iki renkli redox durumları arasında yüzde olarak optik değişim ($\Delta\%T$) olarak bilinir. Dönüşüm hızı bir elektro-kromik malzemenin renklendirme/renk açma prosesleri için ihtiyaç duyulan zamandır. Elektro-kromik malzemenin dönüşüm hızı elektrolitin iyonik iletkenliğine, ince filmde iyon difüzyonuna, uygulanan potansiyel miktarına, film kalınlığına ve filmin morfolojisine bağlıdır (Ak vd., 2008).

2.5.4.2 Açık Devre Hafızası ve Kararlılık

Açık devre hafızası elektriksel alan kaldırıldıktan sonra absorpsiyon durumunu malzemenin zamanla unutmaması olarak ifade edilir. Elektro-kromik kararlılık, aktif redoks çiftlerinin indirgenmesinde elektro-kromik zıtlık kaybı ve bundan dolayı elektro-kromik malzemenin performans kaybı ile sonuçlandığından çoğunlukla elektro-kimyasal kararlılık ile birlikte anılır.

Elektrokromik cihazlarda yüksek kararlılık (high stability), hızlı yanıt zamanı (rapid response time), verimli renk değişimi (efficient color change), optik hafıza(optical memory), optik karışıklık(optical contrast), renk kararlılığı (color uniformity) gibi özelliklerin bulunması ticari uygulamaları için önemlidir. Elektrokromik malzemelerin değişik teknolojik uygulamaları mevcuttur. Örneğin: akıllı aynalar, renk taklit eden (bukalemun) malzemeler, ECD, ışık kontrollü akıllı camlar, reklam panoları, kamuflaj malzemeleri, radar absorplama malzemeleri. Elektrokromik cam panelleri hızlı trenlerde yolcu kompartımanı ile kondüktör kamarası arasında kullanılır. Ayrıca Boeing 787 Dreamliner’da da elektrokromik pencereler kullanılmaktadır (Metin & Et Al., 2007) (Bonhôte, Gogniat, Campus, Walder, & Grätzel, 1999).



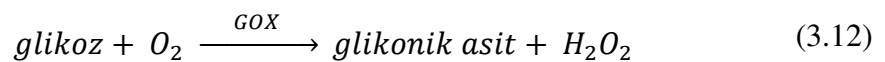
3 BİYOSENSÖRLER

Glikoz en çok yapılan biyolojik tayindir ve milyonlarca diyabet hastası kanlarındaki glikoz düzeyini günlük olarak ölçmektedirler. Glikoz oksidaz (GOx) temelli, amperometrik enzim elektrotlu biyosensörler kullanımı kolay, basit glikoz test metodlarının geliştirilmesinde öncü rol oynamışlardır (Taylor & Schultz, 1996) (Shrestha vd., 2016).

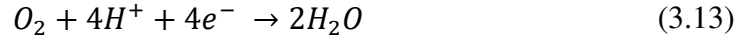
Kitosan (CH) doğal biyoyumlu, biyolojik olarak bozunabilir, yüksek mekanik dayanıma sahip ve çok iyi film oluşturabilme yeteneğine sahip bir biyopolimerdir. Kitosanın çeşitli araştırmalar ve çalışmalar için ilgi çekmesinin sebebi sahip olduğu çok sayıdaki fonksiyonel grup ve mükemmel film oluşturma yeteneğidir. Kitosan sahip olduğu amin ve hidroksil gruplar sayesinde özellikle biyomolekül immobilizasyonu için oldukça elverişlidir (Di Carlo vd., 2012).

Elektrokimyasal olarak üretilmiş polimerlerin enzim immobilizasyonu için biyosensörlerde kullanılması üretimin kolay olması, film kalınlığının ayarlanabilmesi ve seçiciliğinin iyi olması gibi sebeplerden dolayı gelecek vadeden bir teknolojidir. Ayrıca iyi iletkenlik özelliği ve yüksek stabilitesi sebebiyle elektrokimyasal biyosensör yapılarında sıkça iletken polimerler kullanılmaktadır (Tang vd., 2014) (Shrestha vd., 2016).

İlk elektrokimyasal biyosensör çalışması 1956 yılında Cincinnati Ohio'da bir çocuk hastanesinde Dr. L. Clark tarafından çözünmüş oksijen konsantrasyonunu ölçmek amacıyla yapıldı. Ayrıca Clark ve grubu 1962 yılında kardiyovasküler cerrahide sürekli görüntüleme için enzim temelli bir glikoz sensörünü literatüre kazandırdı (Clark & Lyons, 1962). Biyosensör araştırmalarının öncüsü bu konsept bir test çözeltisindeki glikoz konsantrasyonunun ölçümü için Clark oksijen elektrotu üzerinde GOx enziminin tutuklanmasını kapsar. Enzimin katalize ettiği reaksiyonda tüketilen oksijen miktarı glikoz konsantrasyonuyla orantılıdır (denklem 1.1). Bu prototip ilk ticarileştirilmiş enzim elektrotunun ve glikoz analiz edicisinin gelişimi için temel oluşturmuştur. Glikoz analizi, küçük glikoz metreler kullanılarak diyabet hastalarında hayati öneme sahip olan kandaki glikoz seviyesini kontrol etmek amacıyla düşünülmüştür (Taylor & Schultz, 1996) (Clark & Lyons, 1962).



Tüketilen oksijeni ölçmek için negatif bir potansiyel platin katoda uygulanır ve oksijenin indirgenmiş formu değerlendirilir.



Sensör çalışmaları 1970'lerden itibaren boyut ve kolay kullanım bakımından önemli gelişmeler göstermiştir. Updike ve Hicks (Updike & Hicks, 1967) ikili oksijen çalışma elektrotları (bunlardan biri enzim ile kaplanmış) kullanarak ve numunedeki oksijen değişimlerini doğrulamak için diferansiyel akımı ölçerek bu prensibi daha ileriye taşıdılar. 1973 yılında Guilbault ve Lubrano (Guilbault & Lubrano, 1973) hidrojen peroksitin amperometrik (anodik) görüntülenmesine dayanan kandaki glikozun ölçümü için bir enzim elektrotu tasarladılar. Tasarlanan bu biyosensör ile 100 µL'lik kan numunesi test edildiğinde oldukça kesin sonuçlar elde edildi.

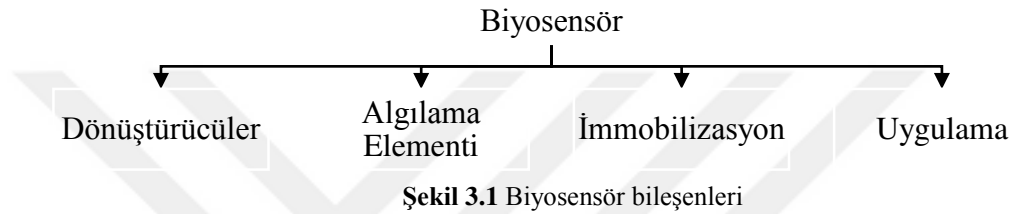


3.1 Biyosensörlerin Temelleri

Bir insan koklamak, tatmak, duymak, görmek ve dokunmak gibi beş tip hissetme elementine sahiptir. Bu sensör elementleri doğada mevcut buluna temel sensör tiplerini gösterir. En basit sensör örneği turnusol kağıdının ortamda asit veya baz olmasına göre renk değiştirmesidir. Turnusol kağıdı ortamda asit yada baz olduğunu renk değişimiyle kantitatif olarak gösterir. Daha kesin bir biçimde asitlik derecesini belirlemek için pH sensörlü olan bir pH metre kullanılır. pH-metrenin elektriksel potansiyel değişimi cihazın iğnesinde veya LCD-ekranında ayırt edilebilir bir harekete dönüşür. Cihazın, fiziksel ya da kimyasal değişimi ışık sinyaline veya elektronik sinyale çeviren parçasına dönüştürücü denir. Bir insandaki algılama elementlerinin fonksiyonları sabitken elektrokimyasal bir sensörün fonksiyonları pH sensöründe olduğu gibi geliştirilen cihazın ölçüm ucunun teknolojisine ve dönüştürücüsüne bağlıdır.

Bir biyosensör birbiriyle sırayla bağlantılı iki temel bileşenden oluşan kimyasal bir tanılama düzeneğidir. Bu bileşenlerden birincisi biyokimyasal bir tanıma sistemi ve ikincisi fiziko-kimyasal dönüştürücüdür. Bu iki bileşen ile numune konsantrasyonu gibi kimyasal bir bilgi analiz edilebilen kullanışlı bir sinyale dönüştürülebilir. Biyosensörün biyolojik bileşeni

katalitik ve katalitik olmayan olmak üzere iki gruba ayrılır. Katalitik bileşenler mikroorganizmalardan, dokulardan ve enzimlerden oluşurken katalitik olmayan bileşenler antikolar, reseptörler ve nükleik asitlerden meydana gelirler. Dönüşüm teknikleri kullanılan biyolojik bileşene bağlıdır. Analitik kimyadaki spektroskopik ve kolorimetrik metotlar gibi fotometrik yöntemleri temel alınır. Ancak kimyasal sensörlerin ve biyosensörlerin çoğu basit ve düşük maliyetli olması sebebiyle elektrokimyasal dönüştürücüleri kullanarak geliştirilirler (Ozdemir, Tuncagil, Demirkol, Timur, & Toppare, 2011) (Azak vd., 2013). Şekil 3.1’de bir biyosensörü oluşturan 4 ana bileşen gösterilmiştir.



3.1.1 Elektrokimyasal Dönüştürücüler

Son yıllarda klinik ve çevresel analizlerde elektrokimyasal tanılama sistemleri hakkında birçok araştırma yapılmıştır. Düşük maliyetli, yüksek hassasiyete sahip, çözücü yoğunluğundan bağımsız, basitçe minyatürleştirilebilen ve bu sayede mikro-üretim için uygun, düşük güç ihtiyacı gerektiren ve benzerlerine nispeten kolay ilgili cihaza uyum sağlayan elektrokimyasal dönüştürücüler düşünüldüğünde bu konunun araştırmacıların dikkatini çekmesi hiçte şaşırtıcı değildir (Mao vd., 2008) . Bu gibi özelliklerinden dolayı elektrokimyasal tanılama metotları kanser, enfeksiyonlar, glikoz, kolesterol, alkol ve birçok biyolojik ajanın tanılanması gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmak için oldukça caziptirler (Singh vd., 2013).

Tipik bir elektrokimyasal glikoz sensörü çalışma, referans ve karşıt elektrot olmak üzere üç elektrotlu bir hücreden oluşur (Vashist, Zheng, Al-Rubeaan, Luong, & Sheu, 2011). Çalışma elektrotu üzerine kaplanan algılama tabakası özellikle glikoza tepki veren enzim gibi aktif malzemelerden oluşur. Analit elektrik sinyalindeki değişimi üreterek yükseltgenmeyi ve indirgenmeyi gerçekleştiren çalışma elektrotu üzerindeki gözenekli mebrana difüze edilir. Elektrik sinyali analit tanıma sinyaline dönüştürülür ve gösterilir. Glikoz tanılama sistemleri için yaygın olarak kullanılan elektrokimyasal metotlar dönüşümlü voltametri (CV), amperometri, voltametri ve yük ölçümüdür (coulometry). CV elektrokimyasal bir reaksiyon

sisteminin elektrot prosesini araştırmak için kullanılan en popüler tekniktir (Zhang, Liu, Chu, Shi, & Jin, 2013) (Ye, Luo, Ding, Chen, & Liu, 2011). nceki bölümde açıklandığı gibi CV grafiğinden (akım-potansiyel) faydalanılarak farklı tarama hızlarında anodik (Epa) ve katodik (Epc) pik potansiyeli arasındaki potansiyel farkı (ΔE_p), tarama hızı ve redoks pik akımı arasındaki ilişki, anodik (I_{pa}) ve katodik (I_{pc}) pik akımı arasındaki ilişki elde edilebilir. Sonuç olarak analitin redoks potansiyeli, elektrokimyasal reaksiyonun tipi (tersinir, tersinmez, yarı tersinir), elektrokimyasal reaksiyonu hızı ve buna bağlı diğer bilgiler ölçülebilir veya elde edilebilir (Reza vd., 2015) (Tang vd., 2014).

Voltametrik, amperometrik ve potansiyometrik olmak üzere üç çeşit dönüştürücü vardır. Amperometrik ve potansiyometrik dönüştürücüler en çok kullanılan elektrokimyasal dönüştürücülerdir. Elektrotların çoğu elektrokimyasal reaksiyonun meydana geldiği potansiyelde inert olan platin, altın, gümüş ve paslanmaz elik gibi metallerden veya karbon bazlı malzemelerden yapılır. Bunlardan ilki olan voltametrik dönüştürücüler analitin oksidasyonu veya indirgenmesi meydana gelinceye kadar algılama sisteminin potansiyeli arttırması (ya da azaltması) ile çalışır ve ani bir akım yükselme/düşme piki elde edilir. Pik akımının ykseklėi elektroaktif analitin (veya redoks mediyatörün) konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Denklem 3.15’ de akım (hem de analit konsantrasyonu) ve pik potansiyeli arasındaki ilişki (Butler-Volmer eşitliği) gösterilmiştir (Bard & Faulkner, 2001).

$$i = i_0 [e^{-\alpha F\eta/RT} - e^{(1-\alpha)F\eta/RT}] \quad (3.15)$$

$$i_0 = AFk^0C \quad (3.16)$$

Burada, i uygulanan potansiyelde elektrokimyasal reaksiyon sırasında üretilen akımı, i_0 başlangıç akımını, α transfer katsayısını, F Faraday sabitini, η pik potansiyelini, R ideal gaz sabitini, T mutlak sıcaklığı, A sensörün yüzey alanını, k_0 standart hız sabitini, C analitin konsantrasyonu gösterir. Analitin oksidasyonu ya da redüksiyonu gerçekleşinceye kadar uygulanan potansiyeldeki artış veya azalışı gösterir. Bu yöntemle elektroaktif potansiyelinin konsantrasyonu ile orantılı olan büyük bir akım üretilir (Bard & Faulkner, 2001). Amperometri alışma elektrotuna indirgeyici veya yükseltgeyici sabit bir potansiyelin uygulanmasını içeren diğer bir yaygın kullanımı olan elektroanalitik tekniktir. İndirgenebilen ya da yükseltgenebilen her analit amperometrik tanılama da kullanılabilir. Öncelikle istenen stabil oksidasyon/redüksiyon potansiyeli bilinmelidir, potansiyel direkt bu değere gider ve elde edilen akım amperometri olarak bilinir. Amperometrik dönüştürücülerde iki elektrot arasında

potansiyel belirlenir ve elektroaktif hücrenin oksidasyonu veya redüksiyonu tarafından üretilen akım ölçülür istenen analitin konsantrasyonu ile bağlantı kurulur (J. Y. Wang, Chen, & Ho, 2013). Denklem 3.15’de uygun oksidasyon (veya redüksiyon) potansiyeli biliniyorsa, potansiyel bu değere sabitlenir ve akım zamanın fonksiyonu olarak kaydedilir. Bu tarz elektrokimyasal dönüştürücü ikinci tipi olan amperometrik dönüştürücü olarak isimlendirilir. Amperometrik bir dönüştürücüde algılanan akım elektroaktif analitin kütle transferine bağlıdır. Sınır akımı ve analitin konsantrasyonu arasındaki ilişki aşağıda gösterilen eşitlikle açıklanır (Bard & Faulkner, 2001).

$$i = \frac{KC}{\ell} \quad (3.17)$$

Burada i sınır akımı, K bir sabit, C çözeltideki analit konsantrasyonu ve ℓ elektrotun difüzyon sınır tabakasıdır.

Üçüncü elektrokimyasal dönüştürücü tipi ise sıfır akımda sensör hücresinin potansiyelinin ölçümünü ifade eden potansiyometrik dönüştürücüdür. Nernst eşitliğine dayanır ve aşağıdaki eşitlikte de gösterildiği gibi potansiyel analitin konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır. Sıfır akımda potansiyel ölçümü yapılır. Potansiyel tanılanacak maddenin konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır (Bard & Faulkner, 2001) (Ozdemir vd., 2011)

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} \quad (3.18)$$

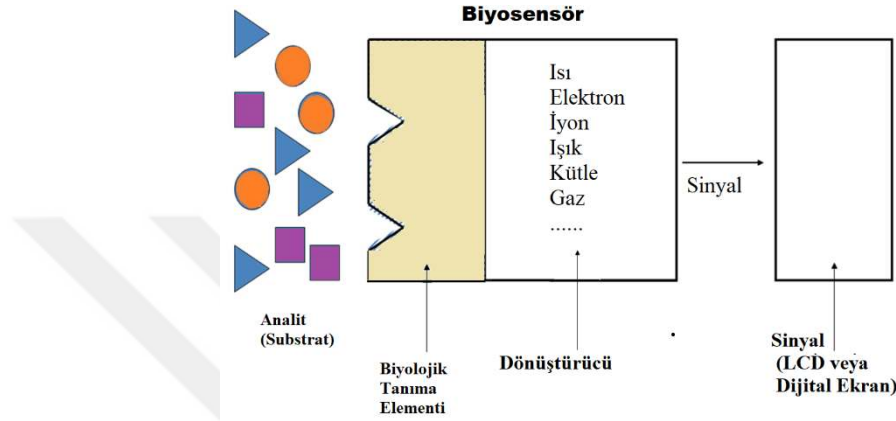
E ve E^0 sırasıyla elektrot potansiyeli ve standart elektrot potansiyelidir, a_{ox} ve a_{red} sırasıyla reaktantların oksidasyon ve redüksiyon aktiviteleridir, R ideal gaz sabitidir, T mutlak işlem sıcaklığıdır, n transfer edilen elektron sayısıdır ve F Faraday sabitidir.

Kondüktometrik dönüştürücüler ise çözeltinin elektriksel iletkenliğindeki değişime bağlı olarak elde edilir. Bunlar genellikle sabit akımda ya da potansiyelde elektriksel iletkenlikteki ölçülebilen bir değişim ile sonuçlanır.

FET-Dönüştürücüler ise alan etkili transistorları (field effect transistor- FET) temel alan dönüştürücülerdir. Bunlar çoğunlukla potansiyometrik, voltametrik ya da kondüktometrik sensörler ile kullanılırlar (Gardner, Varadan, & Awadelkarim, 2001) (Gardner vd., 2001) .

3.1.2 Biyosensör proseslerinin temel prensipleri

Yukarıda açıklandığı gibi farklı tiplerdeki biyosensörlerin cevaplarını sinyale dönüştüren dönüştürücü (transducer) adı verilen cihazlar gereklidir. Biyosensörler substrat ya da analit adı verilen belli biyolojik bir maddenin tanınması ve ölçülmesi ile ilgilenirler. Biyosensörlerin genel şematik planı şekil Şekil 3.2’da gösterilmiştir.



Şekil 3.2’ da görüleceği gibi üçgen şeklinde olan analit veya substrat biyolojik tanıma elementinin üçgen olan kısımlarına yerleşir. Daire ve kare olarak gösterilen şekiller ise girişimci (engelleyici) bileşenleri gösterir. Girişimci bileşenler biyolojik tanıma elementinin üçgen şeklindeki aktif bölgelerine tutunamazlar. Biyolojik tanıma elementi enzim, antikor, DNA veya tam bir hücreden oluşabileceği gibi bu elementi desteklemek ve buna bağlanmak için bir katalizör ve tutuklama matrisinden de oluşabilirler (Joseph Wang, 2008) (Guiseppe-Elie, Brahim, & Narinesingh, 2002). Dönüştürücü mekanizması gazdaki, kütledeki, ışıktaki, iyonlardaki, elektronlardaki, sıcaklıktaki değişime bağlı olan bir elektrokimyasal, optik, termal veya piezzo-elektrik dönüştürücü ile tamamlanır. Genel olarak dönüşüm mekanizması bir bilgi işlem sistemine gönderilebilen elektronik bir sinyalin LED veya dijital bir ekranda çıktısının alınmasıdır (Marks, 2007) (Eggins, 2002).

3.2 Biyosensör Çeşitleri

Fiziksel sensörler, kimyasal sensörler ve biyosensörler olmak üzere başlıca üç sensör grubu vardır. Sensörlerin sınıflandırılması tasarıma, analitlere, uygulamalara vb. diğer kriterlere göre yapılır. Giren enerji tipine bağlı olarak sensörler termal sensörler, radyasyon sensörleri,

mekanik sensörler, manyetik sensörler ve kimyasal sensörler (biyosensörler de dahil olmak üzere) olarak sınıflandırılırlar. Kimyasal sensörler sırasıyla iletkenlik sensörleri, yapısal yarı iletken sensörler, elektrokimyasal sensörler, katı elektrolit sensörler, kimyasal olarak hassas alan etkili transistor sensörler ve diğer tasarım sensörler (biyosensörler, nem sensörleri gibi) şeklinde gruplandırılırlar. Bu çalışmada biyosensörler detaylandırılacaktır.

Biyosensörün temel ayırt edici özelliği analitin tanılama sürecidir çünkü böylece sensörün kendisi seçicilik ve hassasiyeti belirler. Biyosensör tasarımı analitin tipine, konsantrasyonuna ve potansiyel girişimcilere bağlı olarak değişir. Buna göre biyosensörler üç tipten oluşurlar (Gardner vd., 2001) (Hauptmann, 1993).

- 1. Tip 1 Biyosensörler:** Antikor-antijen bağlanma elementleri biyomoleküler tanıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılır. Örneğin bir immün-sensörün seçiciliği ve hassasiyeti antikor-antijen etkileşiminin spesifik ilişkisi ile ve sonuç olarak sistemin gürültü oranının sinyali ile belirlenir (Marks, 2007).
- 2. Tip 2 Biyosensörler:** Bunlar biyokatalitik sensörler olarak ifade edilirler. Bu tip biyosensörlerde sinyal cevap elementi ve tanıma elementi olarak enzimler kullanılır ve bu tip biyosensörler en çok araştırılan ve ticarileşmiş olan biyosensörlerdir. Analitin enzimatik reaksiyonlarının yüksek hızı ve seçiciliği bu tip sensörlere çok iyi seçicilik ve hassasiyet özelliği kazandırır. Enzim, biyokatalitik dönüşümün bir elektriksel sinyale dönüştüğünü garantilemek için, çoğunlukla dönüştürücüyü de kapsayan malzemelere entegre edilir (Setford & Newman, 2005) (Taylor & Schultz, 1996).
- 3. Tip 3 Biyosensörler:** Sentetik biyomimetik biyosensörler olarak tanımlanırlar. Biyosensörlerde sentetik biyomimetik malzemeler doğal biyolojik tanıma moleküllerinin dayanıklılığını arttırmak ve maliyetleri düşürmek için geliştirilmiştir. Moleküler baskılı(imprinted) polimerler doğal moleküler tanımayı taklit eden yapay tanıma elementleridirler. Pestisitler gibi analit çeşitleri moleküler baskılı polimer biyosensörleri geliştirmek için şablon olarak kullanılır. Bu yaklaşımın dezavantajı şablon molekülün tam olarak uzaklaştırma da yaşanan güçlüklerle birlikte ortaya çıkan reaksiyon kinetiğinin kontrol edilememesi, seçiciliğin ve biyosensöre olan affinitenin düşük olmasıdır (Hauptmann, 1993).

3.3 Enzimler

Enzimler yüksek seçiciliğe sahip katalizör proteinlerdir. Enzimler ihtiyaç duyulan aktivasyon enerjisini düşürerek çalışırlar ve buna bağlı olarak oluşum hızında ve ürün miktarında artışa sebep olan reaksiyon hızını arttırırlar. Enzimatik reaksiyonlar katalizör kullanılmayan reaksiyonlara göre oldukça hızlıdır. Bunun yanında substrat etkin bir biçimde çalışmak için enzimin katalitik gereksinimlerine uyum sağlamalıdır. Bazı enzimler protein olmayan, enzimlerin fonksiyonelliğinin veya her fonksiyonunun artışına izin veren kofaktörlere ihtiyaç duyarlar. Enzimler kimyasal reaksiyon sırasında tüketilmezler ve reaksiyon dengesini değiştirmezler. Bir enzimin spesifikliği onun yapısı, yük ve hidrofilik/hidrofobik karakteri tarafından belirlenir (Hauptmann, 1993).

3.3.1 İmmobilizasyon Teknikleri

Glikoz oksidaz enziminin iki membran arasına tutuklanmasıyla başlayan glikoz için enzim bazlı biyosensörler geliştirilmeye başlandığından beri bu biyosensörlerin geliştirilmesi ve enzim immobilizasyonu hakkında literatüre giren birçok araştırma yapılmıştır (Clark & Lyons, 1962). 90'lı yıllardaki sensör atılımının ardından biyosensör araştırmalarına olan ilgi bu sensörlerin klinik, gıda ve çevresel analizler için uygun uygulamaları sebebiyle oldukça arttı. Bu sistemlerin asıl gereksinimi biyolojik tanıma özelliklerini koruyarak, boyutsal dağılımı kontrol edilen sensör yüzeyine enzim veya diğer biyolojik tanıma moleküllerinin immobilize edilmesi veya tutuklanmasıdır (Hauptmann, 1993) (Shirale vd., 2006a).

Yaygın olarak kullanılan çalışma elektrotlarının yapıldığı malzemeler karbon, altın, civa ve platin şeklinde sıralanabilir. Biyosensörler fizikokimyasal bir detektör ile moleküler tanıma bileşenine bağlanarak çalışırlar (Komorsky-Lovrić, 2010b). Enzimler spesifik olmaları, dayanıklılıkları ve dönüştürücü yüzeyine bağlanma yeteneklerinden dolayı sıklıkla kullanılırlar. Enzimin aktif bölgesi ve dönüştürücü yüzeyi arasındaki mesafe düşürülerek elektron transferinde artış sağlanabilir ve hedeflenen analitin analizi hızlandırılabilir. Buna dönüştürücü yüzeyine enzim immobilize edilerek ulaşılabilir (Scheller & Schubert, 1992).

Enzimler çeşitli teknikler kullanılarak tutuklanabilir ancak önemli olan mümkün oldukça enzim aktivitesinde kayıp olmadan uygun metodu seçmektir. Immobilize edilen bir enzimin

performansını etkileyen faktörler taşıyıcının mikro çevresi, difüzyon sabitleri ve taşıyıcının fiziksel yapısıdır. İmmobilizasyon enzimin stabilitesinin artmasına sebep olur ve böylece enzim saklama koşullarına uzun süre dayanır ve çalışmaya devam eder (Lipchik, Killins, Geahlen, & Parker, 2012).

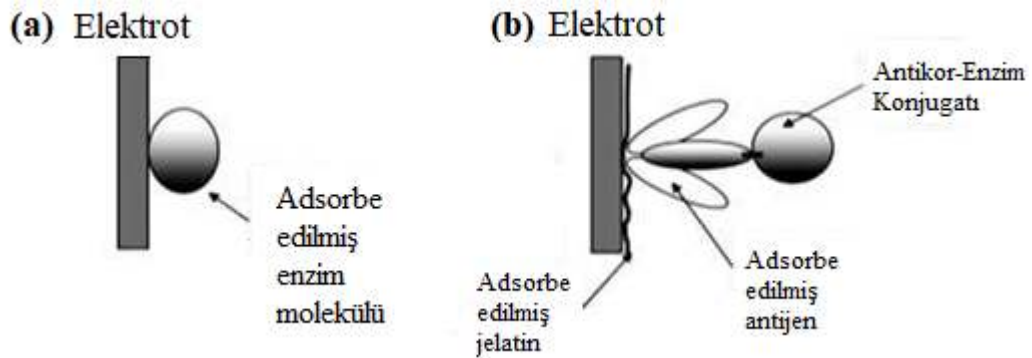
Enzimatik metotlar kullanılarak yapılan glikoz sensörleri ile ilgili birçok çalışma yayınlandı (Shrestha vd., 2016)(Mao vd., 2008). Ancak yeni malzemelerle ve yaklaşımlarla ilgili alanda yapılan çalışmalar biyosensörlerin hassasiyetini ve stabilitesini arttırmak için devam etmektedir (Saleem vd., 2015)(Yavuz, Uygun, & Bhethanabotla, 2010). Genel olarak GOx kan şekerini algılamak için elektrot yüzeyine tutuklanır. İmmobilize edilmiş enzimin uzun süreli stabilitesi önemli bir faktördür. Glikoz oksidaz enzimi tekrar kullanılabilirlik, stabilite, korunma ve saklanma özelliklerini iyileştirmek için farklı tutuklanma teknikleri kullanılarak farklı altlıklar üzerine immobilize edilir (Tang vd., 2014)(Demirkol & Timur, 2011). Düşük maliyetli tutuklanma malzemelerinin geliştirilmesi ve kullanılan metotların performanslarının artırılması araştırma konularının odak noktasında yer almaktadır. Sürekli algılama yeteneğine sahip biyosensörleride kapsayan kimyasal sensörler oldukça dikkat çekmektedirler. Bu analitik metotlarda test maliyetini düşürmek genellikle enzim tüketiminin azaltılmasıyla sağlanır. Örneğin GOx immobilize edilen sistemlerde harcanan enzim miktarı azaltılarak maliyet düşürülebilir (Zhang vd., 2013)(Ozdemir vd., 2011).

Mikrobiyosensör araştırmalarına yönelik ilgi seri üretilebilen minyatür biyosensörlere olan ihtiyaçtan dolayı artmıştır. Özgün tasarıma sahip, düşük maliyetli ve küçük boyutlardaki biyosensörleri üretmek ve geliştirmek ve bu sensörlere enzim immobilizasyonu için yeni yaklaşımlar öne sürebilmek biyosensör çalışmalarının temel hedefi olmuştur (Tuncagil, Odaci, Yıldız, Timur, & Toppare, 2009). Hücre dışı fizyolojik görüntülemeye izin veren, minimum numune hacmi gerektiren biyosensörler için özellikle düşük maliyete eşlik eden uzun ömürlülük ve tekrar kullanılabilirlik çok önemlidir. İmmobilizasyon işlemi enzim aktivitesine engel olacak bir etki olmaksızın enzimin elektrot yüzeyine tutturulmasını gerektirir (Ekiz vd., 2011) (Zor vd., 2014). Ayrıca enzim immobilizasyon prosesi elektrokimyasal biyosensörlerde ki başlıca meseledir. Genel olarak kovalent bağlama, çapraz bağlama, yakalama, mikroenkapsülasyon, adsorpsiyon gibi metotları içeren birçok immobilizasyon yöntemi vardır ve bunlar aşağıda kısaca açıklanmıştır (Shirale vd., 2006b).

Enzimler kompleks sistemlerde hızlı ve doğru olarak hedef molekülü tanıma gibi eşsiz yeteneklerinden dolayı gıda, eczacılık ve biyosensör endüstrilerindeki araştırmaların odak noktasında yer almaktadırlar. Bu üstün moleküler tanıma yeteneği enzimlerin fonksiyonelliğini arttırmak ve farklı tutuklanma matrisleri ve teknikleri kullanılarak tekrar kullanılabilirliğini sağlamak gibi konularda yapılan çalışmaların sayısının artmasına sebep olmuştur (Rauf vd., 2006). Enzimler, çeşitli yollarla immobilize edilerek çok sayıda pratik uygulamada kullanıldı. Enzim tutuklama teknikleri biyosensörlerin sağlam bir biçimde gelişimi için anahtar faktördür. Biyosensörlerin analitik kapasitelerini arttırabilen yeni immobilizasyon metotları ve malzemeler istenir. Glikoz oksidaz, glikonik asite ve hidrojen peroksit molekül oksijen tarafından β -D-glikozun oksidasyonunu katalize eden tat proteinidir veya enzimdir (Uzun vd., 2013) (Zhang vd., 2013) (Ayranci, Soganci, vd., 2015)

3.3.1.1 Adsorpsiyon

Adsorpsiyon fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon olmak üzere iki guruba ayrılır. Fiziksel adsorpsiyon genellikle zayıftır ve Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ve iyon etkileşimleriyle oluşur. Kimyasal adsorpsiyon çok daha güçlüdür ve kovalent bağların oluşumu ile meydana gelir. Adsorbe edilen enzimlerin veya diğer biyomoleküllerin özellikleri çoğunlukla alt tabaka (sustrat), iyonik kuvvet, pH ve sıcaklık değişimiyle değişir (Eggins, 2002). Adsorpsiyon en basit metottur ve minimal hazırlık gerektirir. Şekil 3.3(a)'da adsorpsiyon yoluyla elektrot yüzeyinin modifikasyonu Şekil 3.3(b)'de ise elektrot üzerinde antijen/antikor topluluğunun enzim tutuklayıcı ajan olarak kullanımı gösterilmiştir (Bard & Faulkner, 2001).

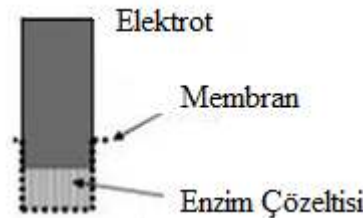


Şekil 3.3 (a) Adsorpsiyon yoluyla enzim tutuklanması (b) Elektrot üzerinde antijen/antikor topluluğu (Lojou & Bianco, 2006)

Bir enzimin adsorpsiyonu enzimin proteini ve kullanılan bağlayıcı matris arasındaki Van Der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi zayıf spesifik olmayan fiziksel etkileşimlerden kaynaklanır. Adsorpsiyon enzimin konfirmasyonunun ya çok az değişmesine yol açar ya da hiçbir değişikliğe sebep olmaz bundan dolayı enzimin aktivitesi değişmez. Kullanılan immobilizasyon matrisi taşıyıcı olarak isimlendirilir. Her enzim her taşıyıcıya başarılı bir biçimde immobilize edilebilir diye bir kural yoktur. Önemli olan ilgili fonksiyonel gruplar ile birlikte uygun taşıyıcının seçilmesidir (Jesionowski, Jakub, @bullet, & Krajewska, y.y.). Enzim taşıyıcıları organik ve inorganik kökenli olmak üzere iki kısma ayrılırlar. Silika, silika jel, metal oksitleri gibi inorganik taşıyıcılar ve kitin, kitosan, selüloz ve alginat gibi organik doğal taşıyıcılar sık sık enzim immobilizasyon ajanı olarak kullanılırlar. Kitosan bu tezdeki bütün biyosensör çalışmalarında iletken polimerler ile birlikte başlıca enzim taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

3.3.1.2 Mikroenkapsülasyon

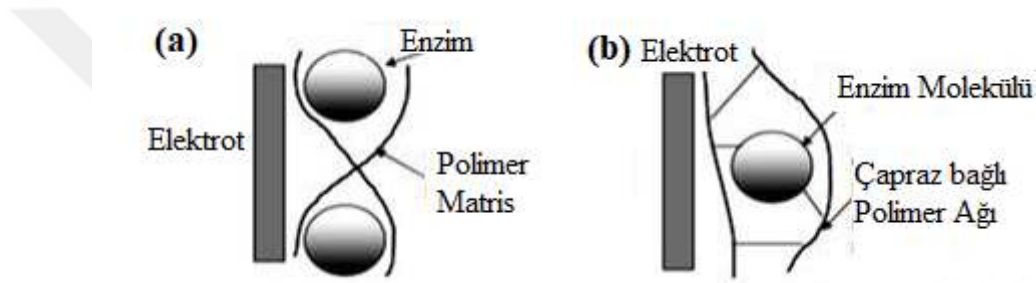
Mikroenkapsülasyon biyosensör geliştirmede kullanılan diğer bir tutuklama metodudur ve sıcaklık, iyon kuvveti ve kimyasal bileşen değişimlerine karşı nispeten dayanıklıdır. Ancak bu sistem biyosensörün seçiciliğini etkileyen küçük moleküller için geçirgen olabilir. Mikroenkapsülasyon oksijen elektrotu üzerinde yapılan ilk glikoz temelli biyosensör çalışmalarında kullanılmıştır. Selüloz asetat ve polytetrafluoroethylene (PTFE - Teflon) membranlar bu yöntemde kullanılmaktadır (Zhao vd., 2016). Şekil 3.4’de görüldüğü gibi bir enzim çözeltisi, hücre süspansiyonu veya bir parça doku ince bir film şeklinde, elektrokimyasal detektörü kapatan, analit için geçirgen olan bir membran tarafından sınırlanır.



Şekil 3.4 Membran elektrotu (Lojou & Bianco, 2006) .

3.3.1.3 Yakalama (Entrapment)

Yakalama genellikle monomer çözeltisi ile biyomolekülün karıştırılıp sonra monomerin polimerize edilip polimer matris oluşturularak gerçekleştirilir (Şekil 3.5 (a) ve (b)). Bu matris jel veya katı formda olabilir. Poliakrilamid bu yöntemde en çok kullanılan polimerdir. Poliakrilonitril, agar jel, poliüretan veya poli(vinilalkol) membranlar, redoks merkezli sol-jel veya redoks hidrojeller, polipirol, nişasta jeli vb. maddeler bu yöntemde kullanılır. Maalesef bu yöntem elektrot yüzeyinin amaçlanan analit için bir difüzyon bariyeri olmasıyla sonuçlanabilir ve enzim aktivitesinin kaybolmasına sebep olur (Shirale vd., 2006a) (Shirale vd., 2006a) (Shirale vd., 2006a) .



Şekil 3.5 (a) Jel/Polimer tutuklanması; (b) Çapraz bağlanma ile tutuklanma (Lojou & Bianco, 2006)

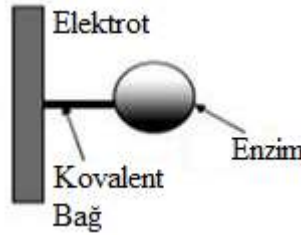
3.3.1.4 Kovalent Bağlama

Kovalent bağlanma enzimdeki ve destek matrisindeki fonksiyonel gruplar arasında özenle tasarlanmış bir bağla gerçekleşir. Katı destek üzerine proteinleri tutuklamak için çeşitli yöntemler kullanılır. Kimyasal çapraz bağlayıcılar katı bir matrise bir proteinin kovalent bağlanması için kullanılan en popüler metottur. Protein yapılı enzimdeki fonksiyonel bir grup ile katı destek yüzeyindeki bir reaktif grup arasında kovalent bağ oluşturulmasıyla gerçekleşen immobilizasyon metodudur (Shirale vd., 2006a).

Hemen hemen bütün homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar proteinleri immobilize etmek için kullanılabilir. Matrisin fonksiyonel grubuna bağlı olarak farklı çapraz bağlayıcılar kullanılabilir. Çapraz bağlama, kovalent bağlanmanın büyümesi, biyo-malzemenin katı destek yüzeyine kimyasal olarak bağlanması tekniğidir. Bazen bu yaklaşım enzimin bozulmasına sebep olabilir. Bununla birlikte adsorbe edilen enzimin stabilizesi için kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır (Shirale vd., 2006a). Çapraz bağlanma reaksiyonu enzim aktivitesinin

azalmadığından emin olmak için düşük sıcaklık, düşük iyon gücü ve nötr pH şartları altında gerçekleşmelidir. Genel olarak enzimin katalitik aktivitesiyle ilişkili olmayan $-NH_2$, $-CO_2H$, $-OH$, $-SH$ ve imidazol gibi fonksiyonel gruplar biyosensör membranına veya dönüştürücüye kovalent olarak bağlanır. Bu yöntem sensör uygulaması sırasında analit kaçağını minimize eder. Kovalent bağlanma en iyi enzim tutuklama yöntemidir (Eggins, 2002).

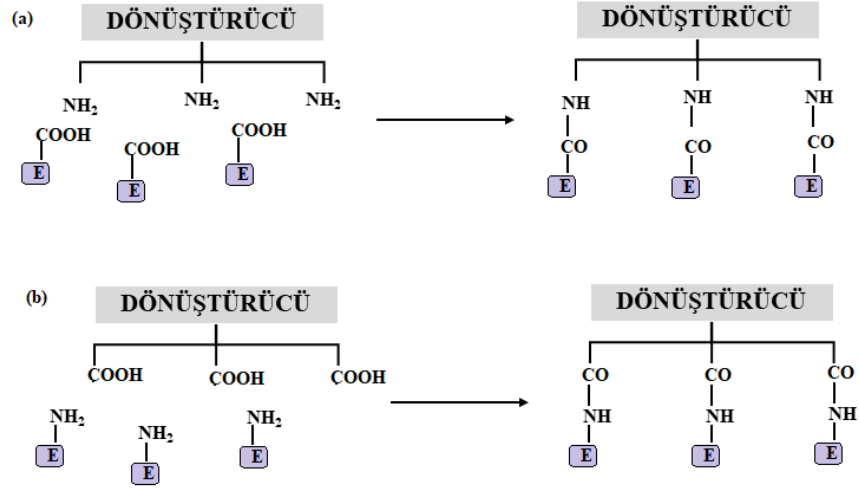
Alıcı membran yüzeyine kovalent olarak bağlanarak yüzeyi aktif hale getirir. Yüzey aktivasyonu için glutaraldehit, karboimid, çok tabakalı avidin-biyotin silanizasyonu gibi bifonksiyonel gruplar kullanılır (Şekil 3.6). Aktive edilmiş birçok membran ticari olarak mevcuttur (Ramanavičius, Ramanavičiene, & Malinauskas, 2006). Glutaraldehit protein tutuklanmasında kullanılan en yaygın bifonksiyonel çapraz bağlayıcıdır. Glutaraldehit ile çapraz bağlanma kimyası oldukça karmaşıktır. Reaksiyon, pH, sıcaklık ve iyonik kuvvete bağlıdır. Glutaraldehit amin grupları ve imidazol, tiyol, hidroksil gibi fonksiyonel gruplar ile reaksiyona girebilir. Glutaraldehit enzim elektrotları için veya biyosensör kullanımı için GOx membranına hazırlanması için kullanılır (Wong, 1991) .



Şekil 3.6 Kovalent bağlanma (Lojou & Bianco, 2006)

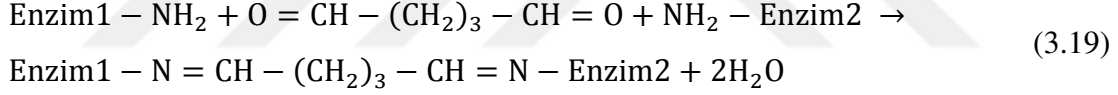
Katı bir destek üzerine proteinlerin immobilizasyonunda proteinin aktivitesini optimum düzeyde tutmak için dikkate alınması gereken birçok faktör vardır. Proteinler, analit çevresindeki aktif bölgeleri veya bağlanma alanları erişilebilir olacak şekilde yönlendirilerek yüzeye bağlanmalıdır ve matris tarafından ya da matris yüzeyindeki diğer bileşenler tarafından bloke edilmiş veya örtülmüş olmamalıdır. Proteinin reaktifliği düştüğünde kimyasal olarak değişme ihtimalinin olduğu dikkate alınması gereken diğer bir husustur (Marks, 2007)

Birçok durumda katı destek üzerine enzimin kovalent bağlanması, bir karbodiimid ile enzimin karboksilik yan halkaları aktive edilerek amino grup içeren bir yüzeyin kondenzasyonla türetilmesiyle gerçekleştirilir (Şekil 3.7(a)). Diğer durum ise karbodiimid ile enzimin amin grupları aktifleştirilerek katı destek yüzeyine kovalent olarak bağlanmasıdır (Şekil 3.7(b)) (Ramanavičius vd., 2006) (Fang & Hu, 1999) .



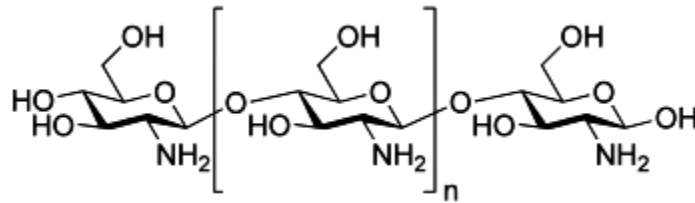
Şekil 3.7 Katı bir destek üzerine enzimin kovalent bağlanması (a) enzimin karboksil grupları aktifleştirilerek, (b) enzimin amino grupları aktive edilerek

Bununla birlikte glutaraldehit ile direkt olmayan çapraz bağlanma diğer immobilizasyon teknikleri ile birleştirilerek kullanılması sensörün stabilitesinin artmasına sebep olur (Khan, 1997). En çok kullanılan çapraz bağlanma ajanı aldehit grupları proteinin yan halkalarındaki amin grupları ile tepkimeye giren glutaraldehittir. Denklem 3.19’da glutaraldehit ile moleküller arası çapraz bağlanma gösterilmiştir.



3.3.1.4.1 Kitosan

Kitosan dünyanın en bereketli organik kaynaklarından biri olan ve kabukluların kabuğundan elde edilen kitinden üretilir. Kitosan rastgele dağıtılmış β -(1,4)-bağlı D-glikozamin ve N-asetil-D-glikozamin gruplarından oluşmuş lineer bir poliaminosakkarittir. Kitosan yapısından dolayı kullanışlı kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı birçok araştırmanın konusu olmuştur (Shrestha vd., 2016) (Reza vd., 2015) (Khor & Whey, 1995)(Demetgül & Serin, 2008). Kitosanın kimyasal yapısı Şekil 3.8’de gösterilmiştir.

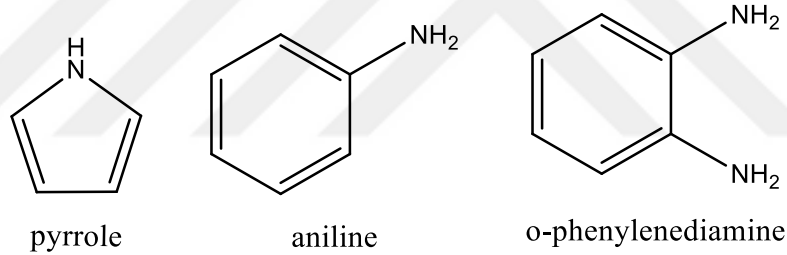


Şekil 3.8 Kitosanın kimyasal yapısı

Kitosan 6,5'dan küçük pH'larda sulu asidik ortamda çözülebilir. Çözüldüğünde amino grupları üzerinde yüksek bir pozitif yük taşır. Kitosan negatif yüklü yüzeylere yapışma ve polianyonik bileşenlerin yığılma yeteneği neticesinde jel oluşturma özelliğine sahiptir. Kitosan ayrıca mükemmel biyo-uyumluluk, toksik olmama ve protein benzerliği gibi özelliklere de sahiptir (Krajewska, 2004) .

3.3.1.4.2 Polimerizasyon

Polimerizasyon Monomerin yapısına bağlı olarak kimyasal, elektropolimerizasyon ve fotopolimerizasyon metotlarından biriyle gerçekleştirilebilir. Elektrokimyasal biyosensör tekniğinde en çok kullanılan teknik elektropolimerizasyon tekniğidir (Soganci vd., 2017) (Soganci, Soyleyici, Ak, & Cetisli, 2016). Elektrokimyasal polimerizasyonda en çok kullanılan monomerler pirol, anilin ve o-fenilendiamindir ve son yıllarda SNS türevi elektroaktif monomerlerde bu amaçla kullanılmaktadır (Ak vd., 2010) (Söyleyici vd., 2013) (Şekil 3.9)



Şekil 3.9 Elektrokimyasal polimerizasyonda en çok kullanılan monomerler

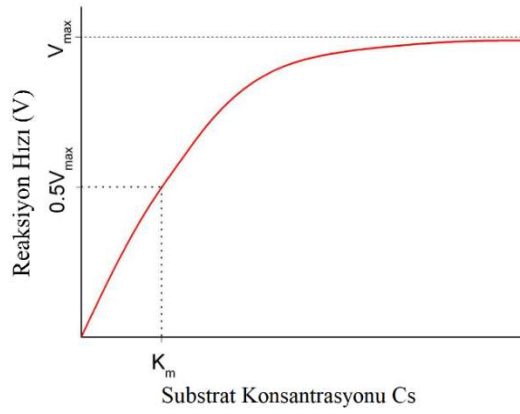
İletken polimerler ile immobilize edilmiş enzim arasında direkt elektron transferinin olduğuna dair delil vardır (Cosnier, 1999). Polimer film aynı zamanda askorbik asit gibi girişimci maddelere karşı bariyer görevi yapabilir (Guler, Soyleyici, Demirkol, Ak, & Timur, 2014). Redoks mediyatörler polimerleştirilip enzim tutucusu ve yük aracı olarak çalıştığı gösterildi (Ayranci, Demirkol, Ak, & Timur, 2015). Pirol ve türevlerinin özellikle çözücüde (Ustamehmetoğlu, Kızılcı, & Demir, 2012) (Ak, Ak, & Toppare, 2006) (Kart, Ebru Tanboğa, Soyleyici, Ak, & Kart, 2014) (Ayranci, Demirkol, vd., 2015), metal destek üzerinde (Saçak, Karakişla, & Akbulut, 1997), anyonla (Vork, Schuermans, & Barendrecht, 1990), elektrokimyasal parametrelere bağlı olarak (Soganci vd., 2017) (Ayranci, Soganci, vd., 2015) (Kurtay vd., 2014) polimerizasyonu hakkında birçok çalışma yayınlandı. Ayrıca elektroanalitik (Namboothiry vd., 2007) (Gurunathan, Murugan, Marimuthu, Mulik, & Amalnerkar, 1999a), optik (Colina, Ruiz, & Heras, 2014) (Soganci vd., 2014), elektriksel

iletkenlik (Yağmur vd., 2013) (Soganci, Ak, Ocal, & Karakus, 2015), morfolojik (Ayranci vd., 2017) özellikleri ile ilgilide birçok çalışma yapıldı. Bu tip polimerler enzim (çoğunlula glikoz oksidaz) tutuklanma adresidirler (Dai vd., 2015) (Tang vd., 2014) (Zhang vd., 2013).Enzim konsantrasyonunun (Shin & Kim, 1996), monomer tipinin (Ayranci, Soganci, vd., 2015) ve konsantrasyonun (Guler vd., 2014) elektrokimyasal cevap üzerindeki etkisi saptandı. Film kalınlığı gibi (Reza vd., 2015) immobilizasyon matrisinin fiziksel özelliklerine değinildi ve elektropolimerizasyon şartları ile ilişkilendirildi (Shrestha vd., 2016) (Wu, Pan, Bao, & Li, 2011) (J Wang, Cao, & Lu, 2015).

Son yıllarda iletken polimerlerin mükemmel optik, iletkenlik ve stabilite gibi özelliklerinden dolayı ve kitosanın biyopolimer oluşu, mükemmel film oluşturma yeteneği ve sahip olduğu aktif gruplar sebebiyle biyosensör çalışmalarında büyük dikkat çeken malzemeler olmuşlardır. Kitosan ve iletken polimerlerin bu iyi özellikleri birleştirilmesi ve yeni biyosensör sistemlerinin tasarlanması üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Kitosan (CH) ve iletken polimerlerle yapılan yeni nesil biyosensörler; PANİ/CH kullanılarak GOx kompoziti (Thambidurai & Pandiselvi, 2018) , PEDOT/CH ile GOx glikoz biyosensörü (David, Barsan, Brett, & Florescu, 2018) , PPy/CH xanthine biyosensörü (Dervisevic, Dervisevic, Çevik, & Şenel, 2017) , CH/PPy/Karbon nano tüp GOx glikoz biyosensörü (Sharma & Kumar, 2016) , PPy-Nafion/karbon nano tüp/CH GOx glikoz biyosensörü (Shrestha vd., 2016) güncel çalışmalara örnek olarak verilebilir. Ancak bu çalışmada kullanılan ‘iletken polimer katkılı kompozit hazırlama tekniği’ özgündür ve literatürde bulunmamaktadır.

3.3.2 Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği substratın enzim vasıtasıyla ürüne dönüştürüldüğü reaksiyonun hızının tespit edildiği bir çalışmadır. Bu çalışmalar farklı reaksiyon şartlarının enzim performansını nasıl etkilediğini anlamaya çalışmak amacıyla yapılır (Bugg, 2004) . Bir reaksiyonu enzimin katalize etme hızı enzimin (C_E) ve substratın (C_S) konsantrasyonuna bağlıdır. Belirli bir C_E ’de ortamdaki C_S nispeten az ise reaksiyon hızı lineer olarak artar ve bu ortamda reaksiyonu katalize etmek için yeterince enzim olduğunu gösterir. Bununla birlikte C_S arttıkça reaksiyon hızı bir platoya ulaşır ve enzimin reaksiyonu maksimum katalize edebilme hızını gösteren V_{max} ’a ulaşılır (Bugg, 2004) . Reaksiyon hızı ve substratın konsantrasyonu arasındaki ilişki Şekil 3.10’de gösterilmiştir.



Şekil 3.10 Reaksiyon hızına karşı substrat konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi.

Günümüzde hala yaygın bir biçimde kullanılan Enzim kinetiğinin matematiksel ifadesi Michaelis ve Menten tarafından ilk olarak 1909 yılında sunuldu. Onların modeli enzimatik reaksiyonların iki aşamada gerçekleştiği varsayımına dayanır. Birincisi enzim tersinir olarak bir kompleks oluşturmak için substrata bağlanır. İkinci aşamada ise kompleks enzimin katalize ettiği reaksiyon sonucunda ürüne dönüşür. Bunun matematiksel ifadesi denklem 3.20’de gösterilmiştir.



Burada k_1 , k_{-1} ve k_2 [s^{-1}] kinetik parametrelerdir. Buna Michaelis – Menten kinetik modeli adı verilir ve bazı varsayımlara dayanır. Bu yaklaşımlar aşağıdaki gibi sıralanır:

- Enzim tek substrata bağlanır
- Ürün oluşumu tersinmezdir ve ürün enzime bağlanmaz
- Reaksiyon başlamadan önceki enzim konsantrasyonu ile reaksiyon bittikten sonraki enzim konsantrasyonu aynıdır, değişmez.
- Ortamda inhibitör yoktur

Michaelis-Menten modelinden türetilen reaksiyon hızı ve substrat konsantrasyonu arasındaki ilişki denklem 3.21 ile formüle edilmiştir. Burada v_0 reaksiyonun başlangıç hızı, v_{max} reaksiyonun maksimum hızı, S substrat konsantrasyonu ve K_m Michaelis-Menten sabitidir (denklem 3.22) ve Şekil 3.10’de gösterildiği gibi v_{max} ’ın yarı hızındaki substrat konsantrasyonu olarak tanımlanır. Bu sabit enzim performansını göstermek için kullanılır (Bugg, 2004).

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3.21)$$

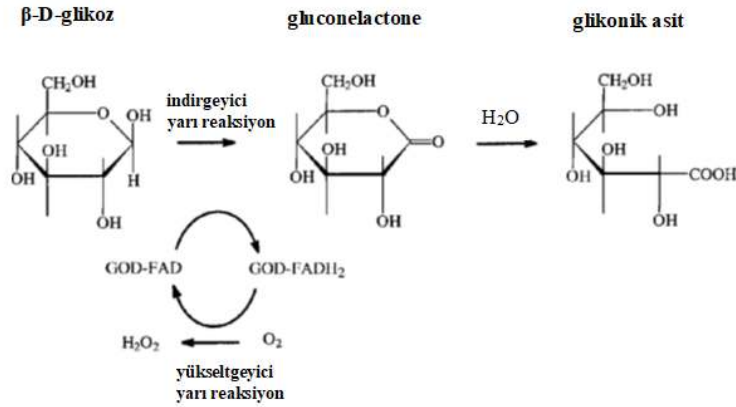
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3.22)$$

K_m ' i tespit etmek için kullanılacak yöntem ilerideki bölümlerde açıklanacaktır.

3.3.3 Glikoz Oksidaz Enzimi

Glikozun oksidasyonu için en çok kullanılan iki enzim *Aspergillus niger* kaynağından elde edilen glikoz oksidaz (GOx) ve *Acinetobacter calcoaceticus* kaynağından elde edilen glikoz dehidrojenaz enzimidir (D'Costa, Higgins, & Turner, 1986). Bu çalışmada biyosensörün fonksiyonel parçası olarak görev alan GOx'in yapısı ve özellikleri hakkında aşağıda kısaca bilgi verilecektir.

Glikoz oksidaz flavin adenin dinükleotid (FAD) kofaktörü içeren gıda parçalayan enzimler grubunda yer alır. FAD enzime kovalent olarak bağlanmaz ve glikoz oksidasyonu için gereklidir (D'Costa vd., 1986). GOx redoks bir reaksiyonu yükseltgeyen-indirgeyen ve elektron vericiden (glikoz) elektron alıcıya (FAD kofaktör) elektronların transferini katalize eden bir katalizördür. Bu reaksiyon Şekil 3.11'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11 β-D glikoz ile GOx'in reaksiyonunun şematik gösterimi (D'Costa vd., 1986)

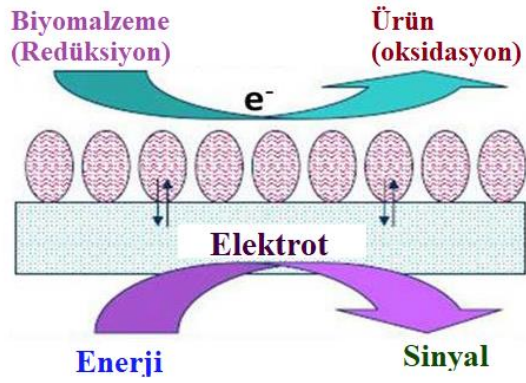
β-D glikoz'un ilk yarı reaksiyonunda enzim tarafından D-glucono-1,5-lactone'a (gluconolactone) yükseltgenir ve bu daha sonra kendiliğinden glikonik aside hidrolize olur. FAD kofaktör ikinci yarı reaksiyonda elektron alıcı gibi davranır ve moleküler oksijen tarafından, yüksek indirgenme potansiyeline sahip olması sebebiyle, yükseltgenen FADH2'ye indirgenir. Oksijen daha sonra reaksiyonun elektroaktif ürünü olan hidrojen perokside indirgenir (D'Costa vd., 1986).

GOx oldukça seçicidir ve sadece bir halka şeklinde olan β -D-glikoz ile reaksiyonu katalize eder ve diğer anomerik α -D-glikoz formlarını katalize etmez. Bununla birlikte insanlarda α -D ve β -D-glikozun her ikisinin dengede olması sebebiyle birinin konsantrasyonunun bütün glikoz konsantrasyonlarıyla orantılı olduğu yaklaşımı yaygın bir biçimde kabul edilmektedir (Bugg, 2004) (Wohlfahrt vd., 1999) (Witt, Wohlfahrt, Schomburg, Hecht, & Kalisz, 2000) .

3.4 Elektrokimyasal Glikoz Biyosensörlerin Uygulamaları ve Çeşitleri

Tipik bir katalitik biyosensör sinyal dönüştürücü bir ara yüzey düzeneği ve bu ara yüzeyde bulunan bir enzim tabakasından oluşur. Biyosensörlerin, canlı organizmaların, hayvanların ve bitkilerin dokularından elde edilen tam hücreleri, hücre bileşenlerini veya hücre altı elementlerini kapsamaları için stratejilerin geliştirilmesine yönelik oldukça çok araştırma vardır. Elektrokimyasal biyosensörler geliştirilinceye kadar elektrot ve enzim arasındaki elektron transferi konusunda metaloenzimin redoks aktif merkezine derince gömülmesinden dolayı oldukça büyük sorunlar yaşanmıştır (Lu, Zou, & Li, 2007). Enzim esaslı biyosensörler yapılırken mediyatörler, destekçiler veya diğer özel malzemeler kullanılarak elektron transferi kolaylaştırılabilir (Joseph Wang, 2005). Elektron transferinin kolaylaştırılması ve enzim immobilizasyonunun iyi bir biçimde gerçekleştirilebilmesi için iletken polimerler ve çeşitli aktif grup içeren biyopolimer kitosan kullanılabilir. Böylece oluşturulan yüzey ve enzim arasındaki elektron transferi iletken polimer vasıtasıyla kolayca sağlanırken kitosan vasıtasıyla da enzim yüzeye tutuklanır (Ren, Deng, Shen, & Gao, 2013) (Kuralay, Demirci, Kiristi, Oksuz, & Oksuz, 2014) .

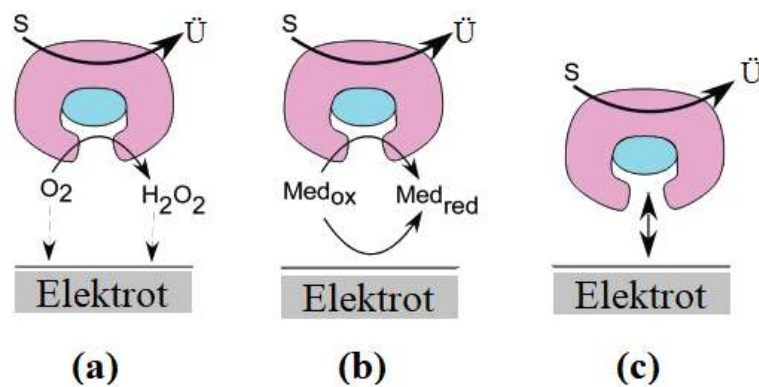
Elektrokimyasal biyosensörler elektronların üretildiği veya tüketildiği bir reaksiyonun enzim ile katalize edilmesine dayanır. Sensor altlığı çoğunlukla referans, çalışma ve karşıt elektrot olmak üzere üç elektrottan oluşur. Karşıt elektrot adı verilen yardımcı elektrotta iyon kaynağı olarak kullanılabilir. Hedef analit çalışma elektrotu üzerinde meydana gelen reaksiyonu kapsamaktadır. Ya sabit potansiyeldeki akım (elektronların akış oranı analit konsantrasyonuyla orantılıdır) ölçülür ya da sıfır akımdaki (bu logaritmik bir cevaptır) potansiyel ölçülebilir. Çalışma elektrotunun potansiyeli elektrik yükünün olmamasına duyarlıdır ve bundan dolayı tipik bir elektrokimyasal biyosensörün transfer mekanizması aşağıdaki Şekil 3.12 gösterildiği gibidir.



Şekil 3.12 Tipik bir elektrokimyasal biyosensörde elektron transferinin şematik gösterimi (Chou, 2011)

Bilimsel Araştırmalarda ve ticari üretimlerde en yaygın olarak kullanılan sensör tipi enzim temelli olan sistemlerdir ve bunlar amperometrik dönüştürücülerle birleştirilirler. Clark ve Lyons (Clark & Lyons, 1962) tarafından üretilen tipteki biyosensörler ‘Birinci Jenerasyon’ olarak adlandırılırlar. Jenerasyon, biyosensörün hangi düzeye entegre olduğunu gösterir. ‘Birinci nesil biyosensörler, membrana tutuklanmış veya bağlanmış biyo-bileşen olan analitin algılanmasıyla sinyalin üretildiği düzeneklerdir. ‘İkinci nesil biyosensörler’ biyo-bileşen elektrot yüzeyine tutuklanır ve sonuç olarak mediyatör aracılığıyla dönüştürücü ve enzim aktif yüzeyi arasında direkt elektron transferi olur. ‘Üçüncü nesil’ biyosensörler İkinci nesil biyosensörlerden farklı olarak direkt elektron transferi için gerekli mediyatörler olmadan enzimin aktif bölgesi ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferini gerçekleştirirler.

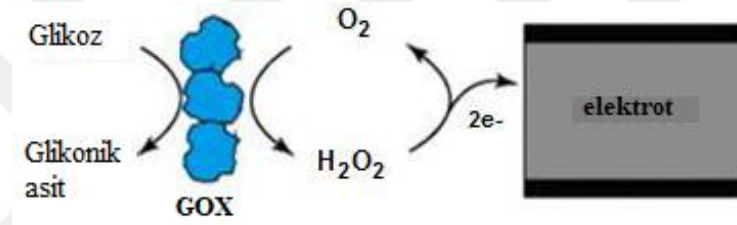
Şekil 3.13’de bu üç nesil glikoz biyosensörün şeması gösterilmiştir.



Şekil 3.13 Glikoz tanılaması için üç nesil amperometrik enzim elektrotu (a) Oksijen kofaktör kullanımı, (b) Suni redoks mediyatör, (c) Elektrot ve GOx arasında direkt elektron transferi; S: Substrat; Ü: Ürün (Chou, 2011)

3.4.1 Birinci Nesil Glikoz Biyosensörler

İlk glikoz biyosensörü çözünmüş oksijen konsantrasyonunu ölçen elektrokimyasal bir biyosensördür ve bu birinci nesil glikoz biyosensörlerin başlangıcıdır. Guilbault ve Lubrano (Guilbault & Lubrano, 1973) tarafından 1973 yılında kandaki glikoz miktarını tayin etmek için bir enzim elektrotu kullanarak tasarladıkları biyosensördür ve bu biyosensör GOx enzimi tarafından katalize edilen glikoz ile çözünmüş oksijen arasındaki reaksiyon sonucunda açığa çıkan hidrojen peroksidin amperometrik olarak görüntülenmesine dayanır. Şekil 3.14’de birinci nesil GOx bazlı standart bir biyosensör şematik olarak gösterilmiştir. Glikozu tanımak ve elektrokimyasal bir sinyal üretmek için bir GOx tabakası kullanılır. Bu sinyal O₂’nin H₂O₂’ye indirilmesi vasıtasıyla enzimden transfer edilir (Cash & Clark, 2010).

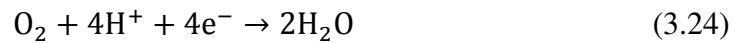


Şekil 3.14 Birinci nesil biyosensör

Birinci nesil glikoz enzim elektrotu yarı geçirgen ayırıcı bir membran tarafından bir oksijen elektrotu üzerinde hapsedilen GOx’in ince bir tabakasından oluşur. Oksijen, denklem 3.23’de gösterildiği gibi enzim ile katalize edilen bir reaksiyona bağlı olarak ölçülür.

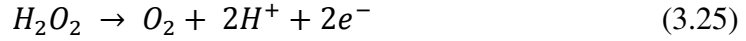


Denklem 3.24’de görüldüğü gibi negatif bir potansiyel oksijen tüketiminin tespiti için platin çalışma elektrotuna uygulandı.



Numune içerisindeki mevcut oksijen bu tip sensörlerde doğru sonuç alınmasını zorlaştırır. Mevcut oksijenin etkisi ve diğer türlerin girişim etkisi, biri GOx ile kaplanmış diğeri ise kaplanmamış iki oksijen sensör elektrotu kullanılarak düzeltilebilir. Bu iki oksijen sensörünün akım çıktılarının farkı daha sonra glikoz konsantrasyonu ölçmek için kullanılır. Bu yaklaşımın kullanımı zordur ve karmaşıktır.

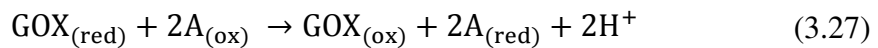
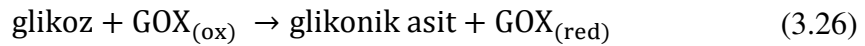
Kandaki glikozun ölçümü için hidrojen peroksit üretiminin anodik oksidasyonunun amperometrik görüntülenmesine dayanan bir enzim elektrotu denklem 3.25’de gösterildiği gibi bildirildi.



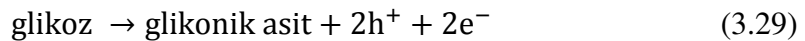
Bu tip ölçümler 100 µL’lik bir kan numunesi için iyi düzeyde doğru ve hassas sonuç verir. Enzimatik reaksiyonla üretilmiş hidrojen peroksitin anodik tayini kandaki glikozu tespit eden biyosensörler için temel bir tekniktir. Glikoz ile reaksiyonu sebebiyle enzimde flavin (FAD) grubunun biyo-katalitik indirgenmesi sonucunda FADH₂’nin indirgenmiş formu üretilir. Glikoz tayini için hidrojen peroksidin direk ölçümünün başta ilerdeki cihaz minyatürleştirilmesi olmak üzere birçok avantajı vardır. Glikoz ölçümleri genel olarak yaklaşık +0.6V olan bir ortalama anodik potansiyelde platin elektrotu üzerinde Ag/AgCl elektrotuna karşı gerçekleştirilir. Maalesef askorbik asidin ve ürik asidin bu potansiyelde oksidasyonu mümkündür.

3.4.2 İkinci Nesil Glikoz Biyosensörler

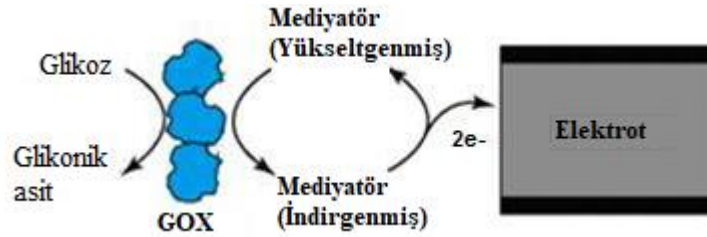
1984 yılında bildirilen İkinci nesil biyosensörler mediyatör temellidirler. Glikoz oksidaz (GOX)’ın flavin adenik dinükleotid (FAD) redoks merkezini çevreleyen kalın protein tabakası direkt elektron transferine karşı bir bariyer ürettiğinden GOX bilinen elektrotlar ile direkt elektron transferi gerçekleştiremez. FAD merkezi ve elektrot yüzeyi arasında elektron getirip götüren veya taşıyan suni mediyatörler kullanılarak bu sorunun üstesinden gelinebilir (Ayranci, Demirkol, vd., 2015).



Genel reaksiyon ise denklem 1.10’da gösterilmiştir.



A(ox) ve A(red) mediyatörün sırasıyla yükseltgenmiş (oxidized) ve indirgenmiş (reduced) halini simgeler. Denklem 3.27’de görüldüğü gibi indirgenmiş form elektrotta mediyatörün yükseltgenmiş formu oluşurken tekrar yükseltgenir. Denklem 3.28’de görüldüğü gibi üretilen akım glikoz konsantrasyonu ile orantılıdır. Glikozu tanılamak için GOx tarafından üretilen sinyal indirgenen kimyasal bir mediyatör tarafından elektrotta iletilir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15 İkinci nesil biyosensör

Oksijen tarafından indirgenmiş GOx’in oksidasyonu genellikle mediyatör varlığında da meydana gelir. Bu ortamda oksijen varmış gibi bir etkiye sebep olur. Ancak mediyatör tarafından transfer edilen elektron hızı enzimin oksijen ile reaksiyonunun hızından yüksek ise oksijen çekişmesi en aza indirilebilir. Diğer taraftan kandaki askorbik asit ve ürik asit gibi diğer bileşenlerin oksidasyonu uygulanan nispeten düşük potansiyellerde bile tamamen yok edilemez. Canlı içi cihazlar da genellikle mediyatörün toksik olmasından ve katıdan ayrılmasından dolayı mediyatör bulunmaz (Cash & Clark, 2010).

3.4.3 Üçüncü Nesil Glikoz Biyosensörler

Üçüncü nesil biyosensörler ise mediyatör kullanmadan, direkt elektron transferine dayanan ve düşük potansiyel uygulanan glikoz biyosensörlerdir. Elektronlar enzimin aktif bölgeleri tarafından glikozdan elektrotta direkt transfer edilir. Mediyatörün olmaması ve düşük potansiyel ve yüksek seçicilik bu yaklaşımın başlıca avantajlarıdır. Elektron verici-alıcı çiftinin mekânsal ayrılığından kaynaklanan direkt elektron transfer yolunun zorluğunun ortadan kaldırılması başlıca üstesinden gelinmesi gereken problemdir. GOx ve elektrot arasındaki direkt elektron transferini mediyatör olmadan gerçekleştiren araştırmalar vardır (Tang vd., 2014). Tasarlanan elektron düzeni immobilize edilmiş enzim ve algılama elektrotu yüzeyi arasındaki elektron transfer mesafesinin mümkün olduğunca kısa olduğunu garanti etmelidir (Ren vd., 2013).

3.4.4 Elektroaktif Girişimciler

Bir glikoz sensöründe yüksek voltajlarda hidrojen peroksidin ölçümü ortamdaki elektroaktif türlerin girişim etkisine bağlıdır. Elektrokimyasal girişimciler glikozdan üretilmemiş olan elektronları vererek hatalı bir glikoz miktarı ölçümüne sebep olabilirler. Tablo 3.1’de standart girişimciler gösterilmiştir. Sensör şeritleri girişimciden dolayı sinyal değişimi olup olmadığını saptamak için düşük glikoz konsantrasyonlarında belli girişimciler ortamda varken ve yokken test edilmelidir. Seçici geçirgen kaplamalar kullanılarak elektrot yüzeyine girişimci girişi minimize edilerek etkisi azaltılabilir. Yük, boyut ve polarite bazlı transfer özelliklerine sahip Farklı polimerler, çoklu katmanlar ve karma tabakalar kullanılarak analit ortamında mevcut bulunan elektroaktif bileşenler bloke edilebilir (Mentana, Palermo, Nardiello, Quinto, & Centonze, 2013) (Gao, Deng, Shen, & Ren, 2013) (Lipchik vd., 2012).

Tablo 3.1 Potansiyel elektrokimyasal girişimcilerin listesi^a

Girişimci	Önerilen test seviyesi (mg/dL)	ref
Acetaminophen	20	1
Salisilik Asit	50	1
Tetracycline	4	1
Dopamine	13	1
Ephedrine	10	2
İbuprofen	40	1
L-DOPA	5	3
Methyl-DOPA	2.5	1
Tolazamide	100	2
Tolbutamide	100	1
Askorbik Asit	3	1
Bilirubin (Unconjugated)	20	1
Kolesterol	500	1
Creatinine	30	1
Triglycerides	3000	1
Ürat	20	1

^a (1) NCCLS Belgesinden EP7-P; (2) Kanın 5L’sinde tam mevcut olan ilaç,10 kat doz oranında, farz edilerek hesaplandı. (3) 10 kat maksimum plazma konsantrasyonu (Bierer & Quebbemann, 1981)

4 MATERYAL VE METOT

Önceki bölümlerde elektrokimyasal yöntemler, uygulamaları, kullanımı, biyosensörler, çeşitleri hakkında bu doktora tezinin amacına yönelik bilgi verildi. Bu bölümde ise bu çalışmada yapılan temel deneysel yöntem, kullanılan malzemeler ve teknikler kısaca anlatılacaktır.

Bu çalışmanın ilk kısmında ITO elektrotu yüzeyinde kompozit hazırlanıp bunun spektroeletrokimyasal özellikleri araştırılmıştır. İkinci kısımda ise grafit elektrot yüzeyinde kompozit hazırlanmıştır ve bu yüzeye glikoz oksidaz enzimi immobilize edilmiştir. Buna bağlı olarak elektrotların sensör olabilme özellikleri incelenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Üç farklı elektroaktif monomer kullanılarak bunların her biri için belirtilen çalışmalar yapılmıştır.

4.1 Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan üç farklı elektroaktif monomer literatürde belirtilen yöntemlerle sentezlenmiştir (Soğancı, 2017). Çalışmada kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

Kitosan (düşük molekül ağırlıklı) Sigma-Aldrich ve asetik asit (% 100) Rieden-de Haen firmasından temin edilmiştir. Kitosan (0,5 wt. %) 0,1M asetik asit çözeltisi (pH < 3,2) içerisinde çözülerek spektroeletrokimyasal deneylerde ve elektrokimyasal sensör deneylerinde kullanılmıştır.

Etanol (mutlak), lityum perklorat (LiClO₄), asetonitril (ACN) ve diklorometan Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Glikoz oksidaz (EC 1.1.3.4, Type VII from *Aspergillus Niger*), D-glikoz ve glutaraldehit çözeltisi (Grade II %25) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. 0,1M D-glikoz çözeltisi 0,1M'lık pH'ı 7 olan tampon çözelti içerisinde hazırlanarak kullanılmadan önce β -D-Glikoza dönüşmesi için bir gece bekletilmiş ve 4 °C'de saklanmıştır.

Sensör deneyleri 0,1M'lık farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltiler hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla pH değeri 3,5'e kadar olan tampon çözeltileri hazırlamak için

sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$) ve pH değeri 8'e kadar olan tampon çözeltileri hazırlamak için sekonder sodyum fosfat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) kullanılmış ve bunlar Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Gerçek örnek testlerinde ticari olarak marketlerde bulunan kola (Cocacola), vişne suyu (Cappy) ve gazoz (Uludağ) örnekleri kullanılmıştır.

Üç farklı monomerin her biri için sentez koşulları ve karakterizasyonları ilerleyen bölümlerde verilmiştir.

4.2 Kullanılan Cihazlar ve Elektrokimyasal Deneyler

Tez kapsamında yapılan çalışmalar daha öncede belirtildiği gibi spektroelektrokimyasal deneyler ve elektrokimyasal glikoz biyosensör deneyleri olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Deneylerde kullanılan cihazlar ve elektrokimyasal deneyler aşağıda açıklanmıştır.

4.2.1 Elektrokimyasal Hücre ve Elektrotların Hazırlanması

Bu çalışmada indiyum tin oksit (ITO) kaplı cam elektrot ve grafit elektrot olmak üzere iki tip elektrot kullanılmıştır. ITO elektrotu kompozitin elektrokromik uygulamaları için grafit elektrotu ise biyosensör platformu hazırlamak ve karakterize etmek için kullanılmıştır. Aşağıda her iki elektrokimyasal hücre ve elektrotların hazırlanışı kısaca anlatılmıştır.

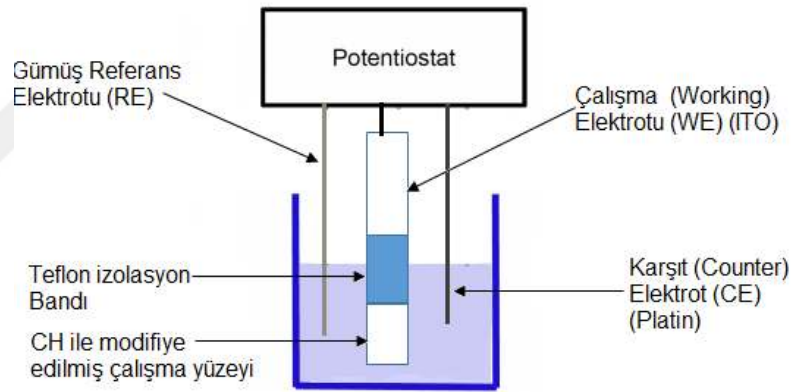
4.2.1.1 Elektrokimyasal Çalışmalar İçin ITO Kaplı Cam Elektrotun Hazırlanması

ITO yüzeyi kullanılmadan önce ilk olarak deterjanlı su içerisinde, ardından saf suda ve en sonunda etanol içerisinde bir ultrasonik karıştırıcı banyo kullanılarak her bir işlem için 15 dk bekletilmiştir. ITO elektrotunun yüzeyinde $1cm^2$ 'lik bir alan teflon izole bant ile sarılarak belirlenmiştir ve bütün deneyler de elektrotlar standart olarak bu şekilde hazırlanmıştır.

Kitosanın asetik asit içerisindeki çözeltisi (CH-AA) daha önce belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden 15 μ l alınarak ITO yüzeyindeki belirtilen alana damlatılmış ve oda

sıcaklığında yüzeyde bir film oluşturulmuştur. Ardından elektroaktif monomer elektrokimyasal polimerizasyon ile daha önce CH ile kaplanmış olan yüzeyde biriktirilmiştir. Üç farklı monomer ile bu işlem yapılmıştır ve her bir monomer için farklı bir organik çözücü ve destek elektrolit kullanılmıştır.

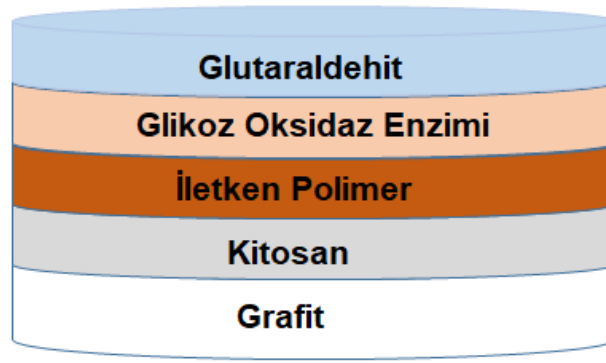
Hazırlanan CH-CP iletken kompozit filminin elektrokromik özelliklerini ve redoks davranışlarını incelemek amacıyla üç elektrotlu bir cam hücre (2 ml) oluşturulmuştur. Çalışma elektrotu, üzerinde kompozit hazırlanmış olan indiyum tin oksit (ITO, Delta Tech. 8–12 μm , 0,7 cm x 5 cm) kaplı cam elektrottur. Karşıt elektrot ve referans elektrotu olarak sırasıyla platin ve gümüş tel (R=1mm) kullanılmıştır ve bunlara her deneyden önce platin için alevle tavlama, gümüş için ince zımpara kağıdı ile zımparalama yapılmıştır ve bütün deneyler oda sıcaklığında (22 ± 2 °C) gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1’de hazırlanan cam elektrokimyasal hücre şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Cam elektrokimyasal hücre

4.2.1.2 Biyosensör Çalışmaları İçin Grafit Elektrotun Hazırlanması

Biyosensör çalışmaları için üç elektrotlu cam hücrede (30ml) bir potansiyostat ile bağlantı kurularak gerçekleştirilmiştir ve meydana gelen akım farkı bir bilgisayar yardımıyla okunmuştur (Şekil 4.2). Çalışma elektrotu olarak grafit çubuklar kullanılmıştır. Her deneyde çalışma elektrotu ve karşıt elektrot saf suyla iyice temizlenmiştir ve deneyler oda sıcaklığında (22 ± 2 °C) gerçekleştirilmiştir. BASi Electrochemistry Instruments firmasından temin edilen Ag/AgCl ve platin tel sırasıyla referans ve karşıt elektrot olarak ve grafit (1,5 mm yarı çapında) çalışma elektrotu olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.3 Grafit elektrot tabanında, CH-CP kompozit malzemesi temel alınarak üretilen glikoz biyosensörü yapılandırmak için kullanılmış olan ‘tabaka-tabaka damlatma yoluyla kaplama’ fabrikasyon prosedürünü özetleyen şematik diyagram

4.2.2 Elektrokimyasal Sistem

Çalışma kapsamındaki elektrokimyasal deneyleri yapmak amacıyla Ivium potentiostat/galvanostat elektrokimyasal çalışma istasyonu (Iviumstat, The Netherlands) ve buna bağlantılı bir bilgisayar kullanılmıştır.

4.2.3 Elde Edilen Kompozit Filmlere Ait Elektrokimyasal Çalışmalar

İletken polimer filmi sabit potansiyel elektroliz yöntemi ve sabit bir döngü hızında dönüşümlü voltametri yöntemi ile oluşturulmuştur. Oluşturulan filmin redoks özelliklerini, reaksiyonun dönüşümlülüğünü, sistemin sitokiyometrisini araştırmak için yani kompozit filmin elektrokimyasal karakterini belirlemek için bu sistem kullanılmıştır.

Dönüşümlü voltametrde polimerizasyon prosesinin difüzyona bağlılığı önceki bölümde de açıklanan Randles-Sevcik (Denklemler 2.9) eşitliği kullanılarak saptanmıştır. Bu eşitlik tarama hızının pik akımı (i_p) üzerindeki etkisini karakterize eder ve redoks çiftleri için pik akımının sadece difüzyon şartlarına (konsantrasyon, difüzyon sabiti, elektrot yüzey alanı, transfer edilen elektron sayısı) bağlı olmadığını aynı zamanda tarama hızına da (v) bağlı olduğunu ifade eder. Elektrokimyasal deneylerde i_p difüzyon ile sınırlanan proseslerde $v^{1/2}$ ile iletken polimerler gibi difüzyondan bağımsız davranışlar gösteren malzemeler ile yapılan işlemlerde ise v ile orantılıdır.

İletken polimerin ortamda mevcut olup olmadığını en iyi açıklayan yollardan biri elektrokimyasal stabilite ile bağlantı olan redoks stabilitesidir. İletken kompozit malzemenin stabil olup olmadığı CV testleriyle açıklanır. İletken polimerlerin redoks prosesler sonucunda aktif merkezlerin uygulanan potansiyel ya da çevresel faktörlerden dolayı aktivitesini kaybetmesi sonucunda stabilite kaybı gözlenir. Kaplanan iletken kompozit monomersiz ortamda uygun potansiyel aralığında ardışık olarak yüzlerce kez döngüye tabi tutularak ilk döngü ile son döngü arasındaki yük yoğunluğu farkından stabilite hesaplanmıştır.

4.2.4 Spektroelektrokimyasal Sistem

Kompozit filmin spektroelektrokimyasal özelliklerini karakterize etmek için Agilent 8553 UV-Vis spektrofotometresi Ivium potansiyostatla birlikte kombine edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla iletken polimere farklı potansiyeller uygulanarak her potansiyel için UV spektrumu alınmıştır.

4.2.5 Elde Edilen Kompozit Filmlere ait Spektroelektrokimyasal Çalışmalar

CH-CP kompozit filmlerinin spektroelektrokimyasal çalışmalar ile uygulanan potansiyele bağlı olarak optik özelliklerini ve elektronik geçişlerini araştırmak mümkündür. Bu amaçla elektrokimyasal yöntem (potansiyometre) ile spektroelektrokimyasal yöntem (UV-görünür bölge spektrofotometresi) birleştirilerek polimerik malzemenin görünür bölgedeki elektrokromik ve optik özellikleri incelenmiştir.

Elde edilen kompozit filmlere ait spektroelektrokimyasal deneyler çalışma elektrotu olarak ITO kaplı cam elektrot, referans elektrot olarak gümüş tel ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektroelektrokimyasal hücre her bir polimer için polimer sentezinde belirlenmiş olan organik çözücü ve destek elektrolitten oluşur ve ayrıca monomer içermez.

Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan potansiyostat ile farklı potansiyeller uygulanarak iletken kompozit filmlerin bu potansiyellerdeki UV-spektrumları ayrı ayrı alınmış ve böylece

spektroelektrokimyasal çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu deneyler yardımıyla kompozit malzemenin spektroelektrokimyasal özellikleri incelenmiştir.

İlk olarak π - π^* geçişlerinin gözlemlendiği dalga boyundaki optik bant boşluğu hesaplanmıştır. Kompozitlerin HOMO (E_{HOMO}) ve LUMO (E_{LUMO}) enerji değerleri literatüre dayanılarak aşağıdaki gibi hesaplanmıştır (Baran vd., 2010). Elektrokimyasal çalışmalarda elde edilen oksidasyon başlangıç potansiyeli ($E_{onset,ox}$) ile spektroelektrokimyasal çalışmalar sonucu elde edilen bant boşluğu (E_g) hesaplamalarda kullanılmıştır. Çalışmalarda referans elektrotu olarak Ag/Ag⁺ elektrotu kullanılmış ve hesaplamalarda bu elektrot temel alınmıştır.

$$E_{HOMO} = -(E_{onset,ox} + 4,75) (eV) \quad (4.30)$$

Planck-Einstein eşitliği ile kompozitin bant boşluğu ve dalga boyu (λ) arasındaki ilişki aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$E_g = \frac{h \cdot c}{\lambda} (eV) \quad (4.31)$$

Burada h Planck sabiti (6.63×10^{-34} J.s) ve c ışık hızıdır (3.0×10^8 m/s). Buradan elde edilen sonuçlarla E_{LUMO} aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$E_{LUMO} = E_g + E_{HOMO} (eV) \quad (4.32)$$

4.2.5.1 Optik Kontrast ve Tepki Süresi Çalışmaları

Spektroelektrokimyasal çalışmalar sonucunda π - π^* geçişlerinin gözlemlendiği nötral durumda okunan dalga boyu değeri baz alınarak kinetik çalışmaları yapılmıştır. Buna bağlı olarak Spektroelektrokimya grafiğinde absorbans değerindeki en yüksek farklılığın gözlemlendiği dalga boyları ve potansiyel aralığında kinetik testler yürütülmüştür. CH-CP kompoziti ile kaplanmış ITO kaplı cam elektrot çalışma elektrotu olarak kullanılarak, monomer bulunmayan ortamda yapılan kinetik deneylerinde zamanla akım yoğunluğundaki değişmelere, görünür bölgedeki absorbans ve potansiyel değişimlerine bağlı olarak elde edilen sonuçlardan faydalanılarak polimer tepki süresi ve optik zıtlık (ΔT) hesaplanmıştır.

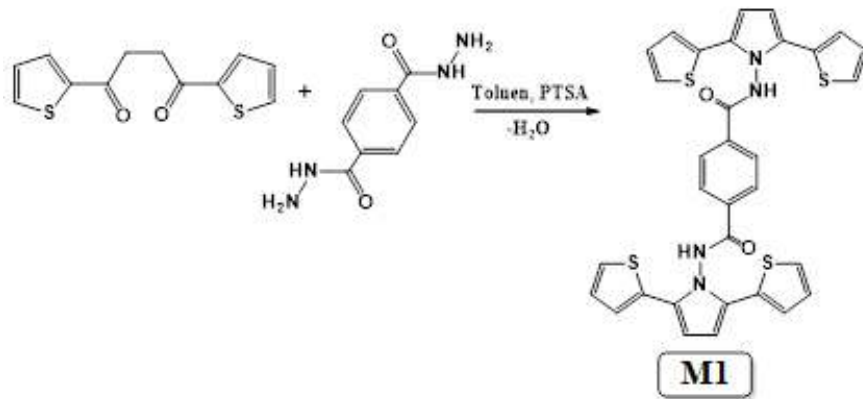
4.2.5.2 In-situ Polimerizasyon

İletken polimerlerin eletropolimerizasyonunu incelemek için in-situ eletropolimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla polimerizasyon hücresi içerisine çözücü, destek elektrolit ve monomer eklenerek UV cihazına yerleştirilmiştir. Belirlenen sabit potansiyel uygulanarak eletropolimerizasyon ilerleyişi belli aralıklarla alınan UV spektrumu yardımıyla izlenmiştir. Polimerizasyon sürecinde CH ile modifiye edilmiş elektrot elektrot yüzeyinde kaplama absorbans değişimleri ile belirlenmiştir.

4.3 Kompozit Hazırlamada Kullanılan Monomerlerin Elektropolimerizasyonu ve Hazırlanan Kompozitlerin Redoks Davranışlarının Araştırılması

4.3.1 N¹,N⁴-bis(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)tereftalamid (M1)'in Elektropolimerizasyonu ve CH-p(M1) Kompozitinin Redoks Davranışlarının Araştırılması

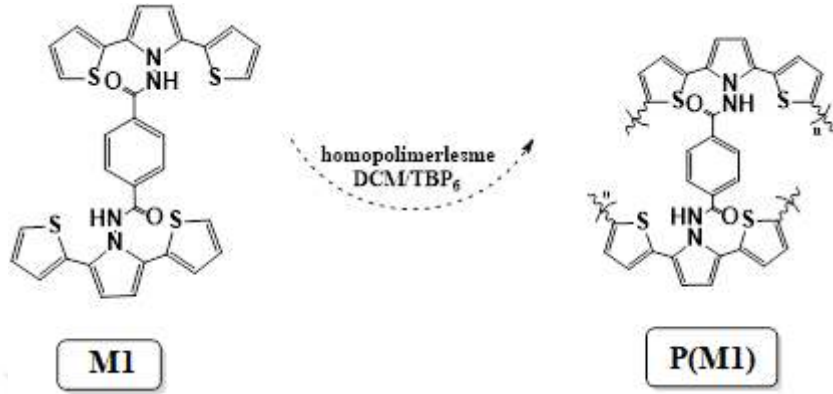
M1 monomeri literatürdeki benzer yöntemle sentezlenmiş (Soganci vd., 2017) ve karakterize edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Elektroaktif (M1) monomeri için sentez şeması

M1 monomeri daha önce belirtildiği gibi üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücrede sabit bir tarama hızında dönüşümlü voltametri tekniği ile polimerleştirilmiştir. Tüm eletropolimerizasyon çalışmaları asetonitril (ACN) organik çözücüsünde 0,05 M M1 monomeri ve 0,1 M lityum perklorat (LiClO₄) destek elektroliti varlığında 250mV/s tarama

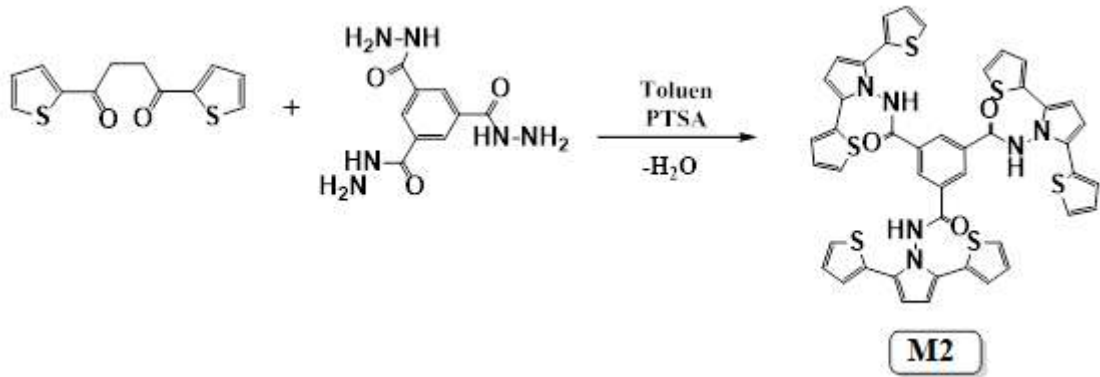
hızında gerçekleşmiştir. Polimer sentezi -0,4 ile 1,4V potansiyel aralığında yapılmıştır (Şekil 4.5). Polimerizasyonun ardından yüzeyde reaksiyona girmemiş monomer kalmaması için elektrot ACN ile yıkanmıştır.



Şekil 4.5 Elektropolimerizasyon ile p(M1) oluşumu

4.3.2 N¹,N³,N⁵-tris(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)benzen-1,3,5-trikarboksamid (M2)'nin Elektropolimerizasyonu ve CH-P(M2) Kompozitinin Redoks Davranışlarının Araştırılması

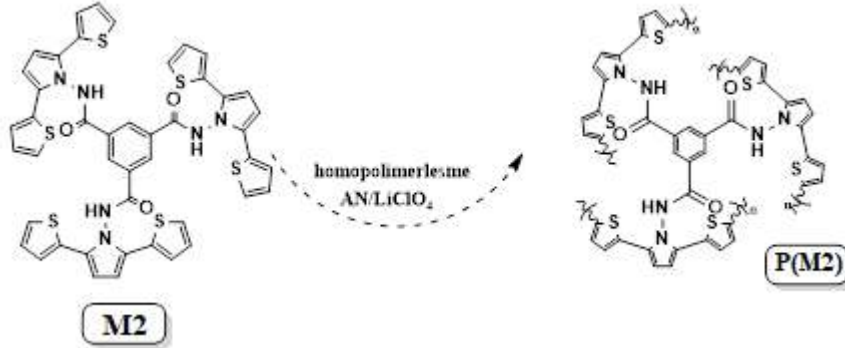
M2 monomeri literatürdeki benzer yöntemle göre sentezlenmiş (Soğancı, 2017) ve sentez şeması Şekil 4.6'de verilmiştir.



Şekil 4.6 N¹,N³,N⁵-tris(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)benzen-1,3,5-trikarboksamid (M2) sentez şeması

M2 monomeri daha önce belirtildiği gibi üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücrede sabit bir tarama hızında dönüşümlü voltametri tekniği ile polimerleştirilmiştir. Tüm elektropolimerizasyon çalışmaları asetonitril (ACN) organik çözücüsünde 1 mM M2 monomeri ve 0,05 M lityum perklorat (LiClO₄) destek elektroliti varlığında 250 mV/s tarama hızında gerçekleşmiştir. Polimerin elektrokimyasal sentezi +0,6 V ile 1,5 V potansiyel aralığında

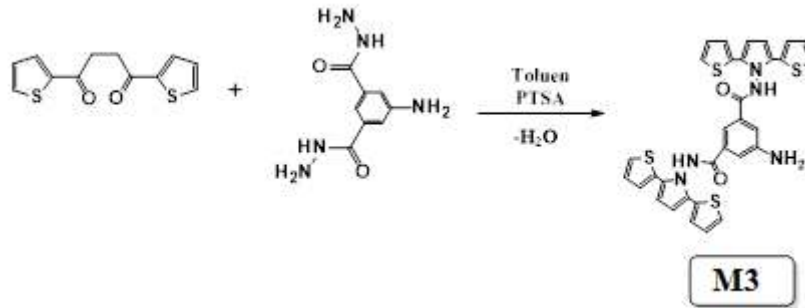
yapılmıştır (Şekil 4.7). Reaksiyona girmemiş monomer kalıntılarından temizlemek amacıyla oluşan polimer filmi ACN ile yıkanmıştır.



Şekil 4.7 Elektropolimerizasyon ile p(M2) oluşumu

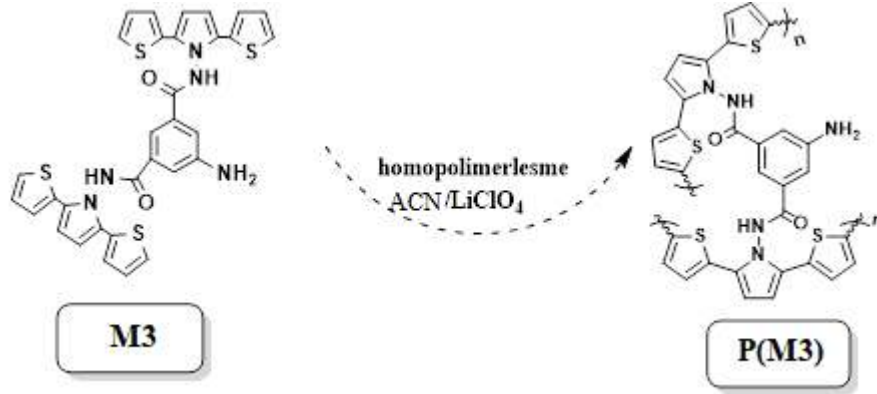
4.3.3 5-amino-N¹,N³-bis (2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl) isoftalamid (M3) Sentezi ve CH-P(M3) Kompozitinin Redoks Davranışlarının Araştırılması

M3 monomeri literatürdeki benzer yönteme göre sentezlenmiş (Soğancı, 2017) ve sentez şeması Şekil 4.8’da verilmiştir.



Şekil 4.8 5-amino-N¹,N³-bis(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)isoftalamid (M3) sentez şeması

M3 monomeri daha önce belirtildiği gibi üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücrede sabit bir tarama hızında dönüşümlü voltametri tekniği ile polimerleştirilmiştir. Tüm elektropolimerizasyon çalışmaları asetonitril (ACN) organik çözücüsünde 1 mM M3 monomeri ve 0,05 M lityum perklorat (LiClO₄) destek elektroliti varlığında 250 mV/s tarama hızında gerçekleşmiştir. Polimer sentezi -0,5 V ile 1,6 V potansiyel aralığında yapılmıştır (Şekil 4.9). Oluşan polimer filmi reaksiyona girmemiş ve polimerizasyonun ardından yüzeyde adsorplanan monomer kalıntılarından temizlenmesi için ACN ile yıkanmıştır.



Şekil 4.9 Elektropolimerizasyon ile p(M3) oluşumu

4.4 Biyosensör Çalışmaları

Grafit elektrotu üzerinde kitosan-iletken polimer (CH-CP) kompozit filmi oluşturmak için elektroaktif monomer sabit bir potansiyel ile yüzeyi kitosan modifiyeli grafit elektrot üzerine elektrokimyasal olarak kaplanmıştır. Enzim immobilizasyonundan sonra oluşturulan biyosensör yüzeyi de elektrokimyasal yöntem ile karakterize edilmiştir.

Biyosensör çalışmaları ve karakterizasyonu elektrokimyasal sistem ile yapılmıştır ve bu çalışmalarda Ivium potentiostat/galvanostat (Iviumstat, The Netherlands) elektrokimyasal çalışma istasyonu ve buna bağlantılı bir bilgisayar kullanılmıştır. Bütün elektrokimyasal biyosensör ölçümleri oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) gerçekleştirilmiştir. Her biyosensör için yapılan spesifik ölçümler ve kullanılan elektrolit ilgili bölümde verilecektir. Tüm potansiyeller için Ag^+/AgCl referans alınmıştır. Bütün elektrokimyasal testler ortam hava sıcaklığında reaksiyon karışımında çözülmüş oksijen varlığında yapılmıştır. Elektrokimyasal testler için tampon çözelti deneye başlamadan hemen önce 10 dakika boyunca saf azot ile köpürtülmüştür ve elektrokimyasal tanılama süresince azot atmosferi sağlanmıştır.

4.4.1 Enzimin Hazırlanması

Glikoz oksidaz enzimi kuru halde pH değeri 7 olan tampon çözeltide çözülerek hazırlanmıştır. Bu amaçla pH değeri 7 olan 10µl tampon çözelti içerisinde 2 mg glikoz oksidaz enzimi çözülmüştür. Hazırlanan bu enzim çözeltisi CH-CP modifiyeli grafik elektrot üzerine

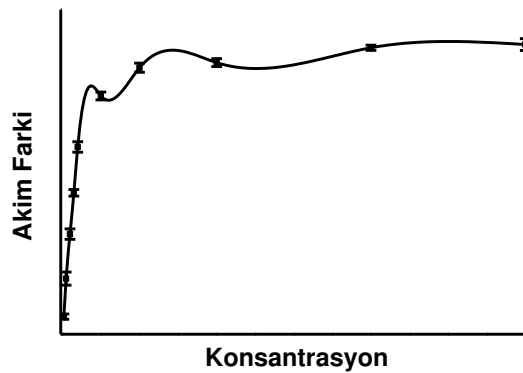
damlatılmış ve kapalı ve karanlık bir ortamda kurutulmuştur. Kullanılmayan kuru haldeki enzim her zaman dondurucuda -4 °C’de saklanmıştır.

4.4.2 pH Optimizasyonu

Biyosensör karakterizasyonu için öncelikle çalışmalar için en elverişli pH değeri tespit edilmiştir ve bu optimum pH olarak ifade edilmiştir. pH 3 ile 8 aralığında değişen 11 farklı pH değerinde denemeler yapılmış ve ortama analit eklendiğinde en yüksek sinyalin elde edildiği değer optimum pH olarak kabul edilmiştir. Bu değer kompozit oluştururken kullanılan monomere göre farklılık göstermiş olup ve bu konu ilerleyen bölümlerde daha detaylı olarak açıklanmıştır.

4.4.3 Kalibrasyon

Optimum pH değerinde ortama eklenen analit miktarının, akım farklık değerleri ile grafiğe geçirilerek doğrusal bölgede kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. 0,1 M’lık glikoz çözeltisinden 5-200 µl aralığında 8 farklı miktarda glikoz çözeltisi elektrokimyasal hücreye eklenmiş ve bunlara karşılık gelen sinyal değerleri okunmuştur. Elde edilen veriler vasıtasıyla kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kalibrasyon deneyinden elde edilen lineerlik grafiği vasıtasıyla tespit edilen lineerlik sınırı içerisindeki miktarlarda glikoz geçek örnek teslerinde kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiğinden (Şekil 2.1) faydalanılarak gözlenme sınırı, gerçek örnek uygulamaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.10 Biyosensör için kalibrasyon grafiği

4.4.3.1 Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırı

Gözlenebilme sınırı (Limit of Detection, LOD) ve tayin sınırı (Limit of Quantification, LOQ) analitik bir prosedür ile güvenilir bir biçimde belirlenebilecek en düşük konsantrasyonunu ifade etmek için kullanılırlar.

Analitik bir prosedürün için LOD, bir numunedeki analitin tespit edilebilen en düşük miktarını ifade eder ancak nicelik olarak kesin doğru sonucun elde edilmesi zorunlu değildir. LOQ ise bir numunedeki analitin deney koşullarında kabul edilebilir bir hassasiyet ve doğruluk ile saptanabilen en düşük konsantrasyonudur.

LOD ve LOQ’u tespit etmek için farklı yaklaşımlar vardır. Bunlardan en yaygın olanları sanal saptama, sinyal gürültü oranından hesaplama, Kör’ün (blank) standart sapmasından hesaplama ve en düşük konsantrasyonda kalibrasyon eğiminden hesaplamadır.

Bu tez çalışmasında biyosensörün kalibrasyon eğrisinin eğimine ve standart sapmasına dayanan LOD ve LOQ tespit yaklaşımı kullanılmıştır. Bu yaklaşım genel olarak aşağıdaki eşitlikte ifade edilmiştir.

$$\frac{DL}{QL} = \frac{F * SD}{m} \quad (4.33)$$

Burada DL (gözlenme sınırı – detection limit), QL (tayin sınırı – quantitation limit), F sırasıyla DL ve QL için 3,3 ve 10’ un çarpanıdır, SD doğru denkleminin standart sapmasıdır ve m doğrunun eğimidir.

Kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğrunun denklemi $y = mx+n$ şeklinde ifade edilir. Bu modelde hassasiyet, doğrunun eğimi m , LOD ve LOQ ile ifade edilir. Bundan dolayı LOD aşağıdaki eşitlik ile gösterilir (Armbruster & Pry, 2008) .

$$LOD = 3\sigma/m \quad (4.34)$$

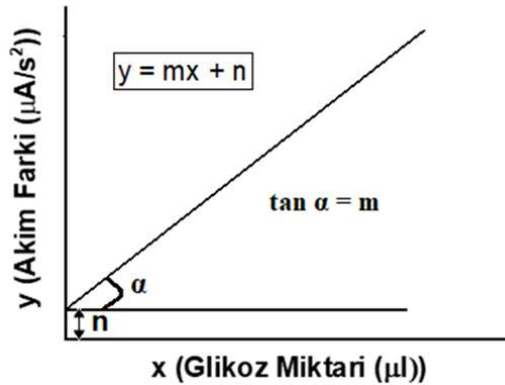
LOQ ise aşağıdaki gibidir.

$$LOQ = 10\sigma/m \quad (4.35)$$

Burada σ düşük konsantrasyonlardaki cevabın standart sapmasıdır. σ regresyon doğrusunun y eksenine göre kaymasının veya y eksenini ile kesişimin standart sapması ile tahmin edilebilir. Bu yöntem her durum için en çok uygulanabilir olan bir metottur ve analiz yöntemi arka plandaki gürültüyü kapsamadığında çok daha kabul edilebilirdir. Kalibrasyon eğrisi için sıfıra yakın en düşük değer kümesi kullanılır ve bu daha homojen bir dağılım yani konuyla alakalı daha uygun değerlendirme ile sonuçlanır.

4.4.3.2 Lineerlik Saptama Sınırı

Lineerlik sınırı kalibrasyon grafiğinde lineerlikten sapmanın başladığı noktadır. Lineerlik Excel’de regresyon istatistik paketi kullanılarak belirlenmiştir. Kalibrasyon grafiğinin en lineer bölgesi alınarak grafiğe geçirilmiş ve seçilen noktaların doğrusallığı elde edilen veriler ve öngörülen veriler arasındaki farka (Residuals Output) bakılarak test edilmiştir. İki değer arasındaki fark 2’den büyük ise bu nokta çıkarılır. Bu metoda ‘n-fit’ adı verilir. Yani n 2’den büyük olduğunda sapma normalden daha büyük olur ve buna sebep olan nokta grafikten çıkarılır. Lineerlik sınırı biyosensörün hangi aralıkta kantitatif analiz için kullanılabileceğini göstermek için kullanılır.



Şekil 4.11 Kalibrasyon grafiğinden elde edilen lineer grafik

4.4.3.3 CH-P(M1) Enzim Elektrotunun Reaksiyon Kinetiği

Michaelis-Menten sabitini belirlemek için birçok yol vardır. Yaygın olarak kullanılan metot akımın tersine karşı substrat konsantrasyonunun tersinin grafiğe geçirildiği Lineweaver-Burke

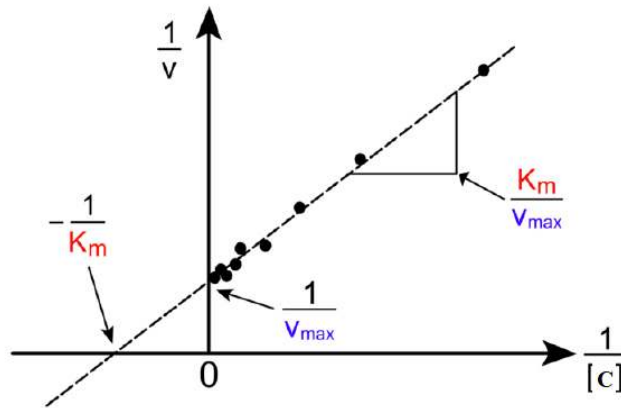
metodudur. Bu Michaelis-Menten eşitliğini (denklem 4.36) analiz etmek için kullanışlı bir grafiksel metottur

$$V = \frac{V_{max}[C]}{K_m + [C]} \quad (4.36)$$

Burada V_{max} maksimum reaksiyon hızını, C substrat konsantrasyonunu, K_m Michaelis-Menten sabitini ifade eder. Eşitliğin tersi alınır (eşitlik 4.37);

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [C]}{V_{max}[C]} = \frac{K_m}{V_{max}[C]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4.37)$$

Burada V reaksiyon hızını ifade eder. Şekil 4.12’de Lineweaver-Burke grafiği gösterilmiştir. Buna göre eğim K_m/V_{max} ’a, y ekseninin kayması $1/V_{max}$ ’a ve x ekseninin kayması $-1/K_m$ ’e eşittir.



Şekil 4.12 Michaelis-Menten kinetiği için Lineweaver–Burke grafiği

4.4.4 Dönüşümlü Voltametri

CV testleri sensör elektrotunu ortamda glikoz varken ve yokken karakterize etmek için yapılmıştır. 0,1M’lık glikoz çözeltisinden 25µl alınarak 10ml tampon çözelti içeren elektrokimyasal hücreye eklenmiştir ve belirli bir potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında testler gerçekleştirilmiştir.

4.4.5 Amperometri

Amperometrik ölçümlerin temel prensibi analit olarak glikozun bulunduğu ortamda enzimin katalitik aktivitesinden dolayı oksijen tüketiminin izlenmesine dayanır. Oksijen miktarındaki azalma -0,7V da Ag/AgCl referans elektrotuna karşı izlenmiştir.

Amperometrik Biyosensör çalışmaları 10ml çalışma tampon çözeltisi içeren (optimum pH ve eklenen glikoz miktarı biyosensöre göre değişiklik göstermektedir), sabit manyetik bir karıştırıcı ile karıştırılan bir reaksiyon hücresinde gerçekleştirilmiştir. Üç elektrot çalışma tampon çözeltisinde 5 dk bekletildikten sonra ölçümler alınmıştır. Her testten sonra kullanılan elektrotlar saf su ile yıkanmış ve tampon çözelti tazelenmiştir.

Akım zamana göre kararlı hale geldikten sonra ortama glikoz eklenmiştir ve akım tekrar kararlı oluncaya kadar beklenmiştir. Biyosensörün ortamdaki glikoz için cevabı iki kararlı durum arasındaki akım farkıdır.

4.4.6 Glikoz Deteksiyonuna Girişimci Madde Etkisi

Biyosensörün girişimci maddelere bulunan ortamlarda davranışı amperometrik yolla belirlenmiştir. Bu amaçla 0,1 M girişimci madde (örneğin etanol) çözeltisi hazırlanarak 0,1V sabit potansiyelde elektrokimyasal hücreye eklenerek sinyal gözlenmiş, Ardından 10µl glikoz ve etanol eş zamanlı olarak ortama eklenerek sensör cevabı karşılaştırılmıştır.

4.4.7 Üretilen Biyosensörlerin Tekrarlanabilirliği ve Sürekliliği

Her bir sensör prosedürü için aynı şartlarda en az 3 farklı sensör elektrotu hazırlanmıştır ve bunlardan elde edilen sinyaller karşılaştırılmıştır.

Hazırlanan sensör elektrotunun özelliğini kaç kullanım sonunda işlevini kaybettiğini yani sürekliliğini araştırmak için aynı elektrotun kullanım sayısı ile sinyal cevapları kaydedilmiştir. Son olarak da hazırlanan elektrot optimum pH değerindeki tampon çözelti içerisinde +4°C’de saklanarak 30 gün sonraki sensör aktivitesi ölçülmüştür.

4.4.8 Gerçek Örnek Analizi

Gerçek numunelerdeki glikoz miktarını tayin etmek için Agilent 8553 UV-Vis spektrofotometrisi kullanılmıştır. Bu amaçla referans metot olarak spektrofotometrik Trinder reaksiyonunu (Glucose MR, Cat. No. 1129010, Cromatest, Barcelona, Spain) temel alan ticari enzim analiz kiti kullanılmıştır ve buradan elde edilen sonuçlar yapılan biyosensörden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Trinder reaksiyonunda glikoz GOx tarafından hidrojen peroksit oluşturarak D-gluconate'a yükseltgenir.

Gerçek örnek analizi için kullanılan prosedür aşağıda sıralanmıştır.

- I. 1ml KİT içerisine 10µl su eklenerek referans hazırlanır (körleme). Bu karışım 20dk bekletildikten sonra spektroskopik olarak absorban ölçümü yapılır.
- II. 10µl standart glikoz çözeltisi 1ml KİT (RGT) içerisinde çözülür. Bu karışımın 500nm'deki absorban değeri okunur.
- III. Gerçek örnekten 1ml alınır ve 50ml saf su ile seyreltilir. Seyreltilmiş gerçek örnekten 10µl alınıp 1ml KİT ile karıştırılır ve 500nm'deki absorban değeri okunur. Bu metotla analit konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıda gösterilen eşitlik kullanılır (Denklem 4.30). Burada x mM (mili molar) cinsinden glikoz konsantrasyonudur.

$$x = \frac{\text{Gerçek Örnek Absorban Değeri}}{\text{Standart Glikoz Çözeltisinin Absorban Değeri}} * 5,55 \quad (4.38)$$

- IV. Biyosensörün kalibrasyon grafiğinin formülü $y = mx + n$ şeklinde çıkarılır. Amperometrik biyosensörün gerçek örneğe verdiği sinyal okunur ve aşağıdaki denklemden (denklem 4.31) faydalanılarak analit konsantrasyonuna ulaşılır.

$$x = \frac{y - n}{m} \quad (4.39)$$

Burada x mM (mili molar) cinsinden glikoz konsantrasyonu, y akım farkını, n kayma miktarını ve m grafiğin eğimini ifade eder.

4.5 Taramalı Elektron Mikroskobu

Elektronların numune yüzeyine yüksek enerji saçmasıyla yüzeyin satır satır taranması metodudur. Hazırlanan kompozit filmlerin ve enzim immobilize edilmiş filmlerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak (JEOL JSM 7001F) karakterize edilmiştir.



5 KİTOSAN (CH) / N¹,N⁴ - BİS (2,5 - Dİ (TİYOFEN-2-YL) - 1H – PİROL–1-YL) TEREFTALAMİD P(M1) KOMPOZİT FİLMİN KARAKTERİZASYONU

Kitosan yeryüzünde en çok bulunan, aktif gruplara sahip, mükemmel film olabilme yeteneği gibi birçok özelliğe sahip olan bir biyo-polimerdir. İletken polimerler ise eşsiz optik ve elektriksel özellikleri, kolay işlenebilir olmaları gibi sebeplerden dolayı özellikle son yıllarda birçok araştırmanın konusu olmuşlardır.

Yeni bir elektroaktif monomer olan, diğer konjuge polimerlere göre daha düşük oksidasyon potansiyeline ve kolay kimyasal ve elektrokimyasal polimerizasyon özelliklerine sahip, 2,5-dithienylpyrrole (SNS) türevi bir monomer olan M1 (Soganci vd., 2017) bu çalışmada CH ile kompozit yapılmak suretiyle kullanılmıştır. CH-P(M1) kompoziti ITO ve grafit elektrot yüzeyinde hazırlanmıştır. ITO yüzeyinde hazırlanan kompozitin elektrokimyasal ve elektrokromik özellikleri araştırılmıştır. Grafit elektrot yüzeyinde ise bir GOx glikoz enzim biyosensörü oluşturulmuştur ve biyosensör özellikleri incelenmiştir.

5.1 CH-P(M1) Kompozitinin Elektrokimyasal Karakterizasyonu ve Elektrokromik Özellikleri

5.1.1 M1 Monomerinin CH ile Modifiye Edilmiş Elektrot Üzerindeki Elektropolimerizasyonu

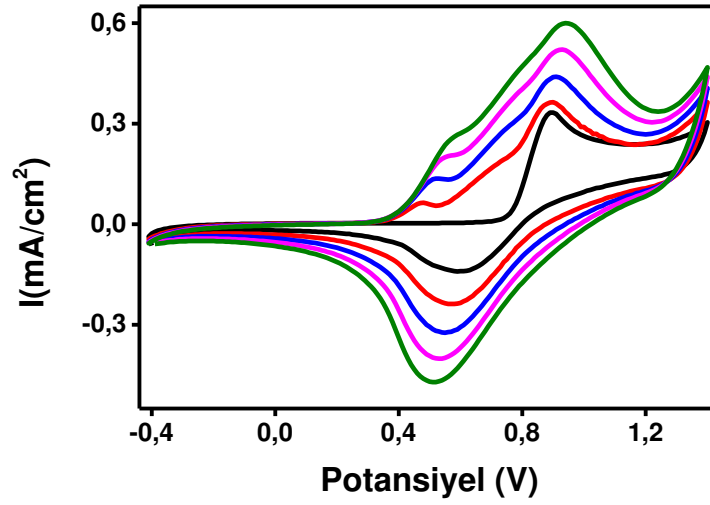
Materyal ve metot bölümünde anlatıldığı gibi ITO kaplı cam elektrot yüzeyi damlatma metodu yardımıyla CH ile kaplanmıştır. CH ile modifiye edilmiş bu elektrotun yüzeyinde elektroaktif M1 monomeri elektrokimyasal polimerleştirilmek suretiyle biriktirilmiş ve iletken biyo uyumlu bir kompozit malzeme elde edilmiştir.

Elektrokimyasal ve elektrokromik çalışmalar 0,1 M LiClO₄/ACN içeren bir çalışma hücresinde yapılmıştır. Bu elektrot yüzeyindeki M1'nin elektropolimerizasyonu ve oluşan

kompozitin elektroaktivitesi dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile araştırılmıştır. Şekil 5.1(a)'da CH-P(M1)'ya ait CV çalışması grafiği verilmiştir. CV grafiğinde ilk döngü monomerin elektropolimerizasyonuna aittir ve buradaki pik monomerin oksidasyonunu göstermektedir. Diğer döngülerde ise biri oluşan iletken polimere diğeri monomere ait olan iki yükseltgenme piki bulunmaktadır. Akım artışını izleyen ardışık döngüler monomerin ITO yüzeyine iyi bir biçimde yapıştığını gösterir. -0,4 V ile 1,4 V potansiyel aralığında yapılan testlerde tersinmez monomer oksidasyon piki CH modifiyeli ITO yüzeyinde 0,34 mA/cm² olarak ölçülmüştür. Oksidasyon pikinin büyüklüğü elektron yoğunluğu ile ilişkilidir.

P(M1) için monomerin başlangıç oksidasyon potansiyeli (onset potential) 0,6 V (Soganci vd., 2017) iken CH-P(M1)'nın 0,76 V'dir. Bu durum ITO yüzeyindeki ince CH filmin iletken olmayan yapısından kaynaklanmaktadır ve CH filmi elektroaktif monomerin polimerleşmesini zorlaştırarak başlangıç oksidasyon potansiyelinin yükselmesine sebep olmuştur. Ancak buna rağmen monomerin polimerizasyonu gerçekleşmiş ve elektrot yüzeyinde elektrokimyasal yolla iletken polimer biriktirilerek istenen kompozit malzeme elde edilmiştir.

M1'nin elektropolimerizasyonu ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde TBP6/DCM destek elektrolit/çözücü sisteminde gerçekleştirilirken (Soganci vd., 2017) CH ile modifiye edilmiş ITO elektrotu kullanıldığında elektropolimerizasyon LiClO₄/ACN içeren hücrede gerçekleştirilmiştir. CH ile modifiye edilmiş elektrot ile yapılan çalışmalar TBP6/DCM ortamında başarısızlıkla sonuçlanmıştır.

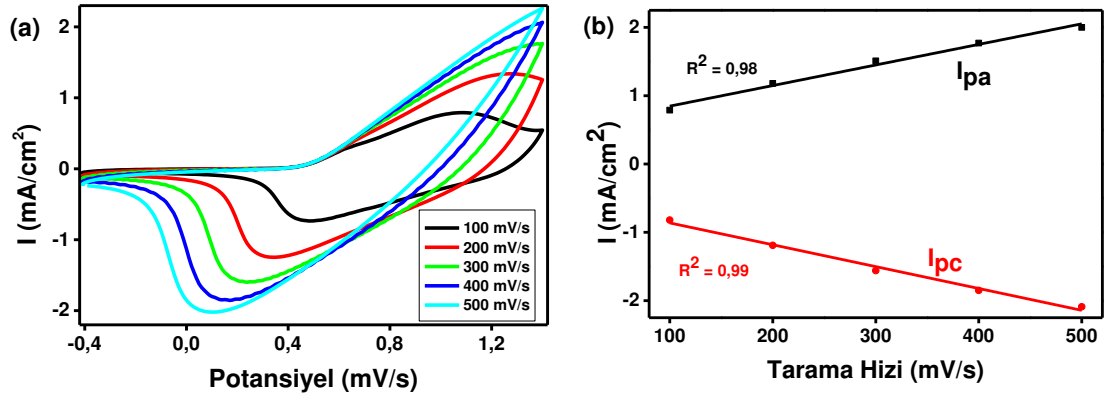


Şekil 5.1 CH modifiyeli ITO kaplı cam elektrot üzerinde 0,05 M M1 için 250mV/s tarama hızında 0,1M LiClO₄/ACN destek elektrolit çözücü sistemi için dönüşümlü voltamogramlar

5.1.2 CH-P(M1)'nın Elektrokimyasal Özellikleri

CH-P(M1)'nın farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri tekniği ile elektrokimyasal özelliklerini araştırılmıştır. Bunun için öncelikle M1 1,4 V sabit potansiyelde 0,1 M LiClO₄/ACN çözeltisinde CH ile kaplanmış ITO yüzeyinde elektrokimyasal yolla polimerleştirilmiştir. Ardından monomer içermeyen LiClO₄/ACN elektrolit çözücü çifti ortamında çeşitli tarama hızlarında dönüşümlü voltametri testleri yapılmıştır.

Şekil 5.2 (a)'da CH-P(M1) kompozitinin farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve Şekil 5.2(b)'de ise Şekil 5.2(a)'dan elde edilen veriler ışığında anodik ve katodik pik potansiyellerinde tarama hızının akım yoğunluğuna göre değişimleri gösterilmiştir. Randless-Sevcik eşitliğine dayanılarak dönüşümlü voltametride bir polimerleşme prosesinin difüzyona bağlılığı tespit edilir. Elektrokimyasal deneylerde tarama hızı akım yoğunluğu ile orantılı ise bu proses difüzyondan bağımsızdır. $I_{pa}/I_{pc} \approx 1$ olması akım yoğunluğu ve tarama hızı arasında doğrusal bir orantı olduğuna ve prosesin difüzyon ile kontrol edilmediğine işaret eder. Buna göre CH-P(M1) için akım yoğunluğu ve tarama hızı arasında doğru orantılı bir ilişki söz konusudur, polimerizasyon işlemi difüzyon kontrollü değildir ve oluşan polimer yüzeye stabil bir biçimde tutunmuştur. Ayrıca $I_{pa} \approx I_{pc}$ olması elektrokimyasal davranışların yarı tersinir olduğunu ve üretilen polimerin kimyasal olarak tersinir olduğunu ispatlar (Ayranci, Soganci, vd., 2015) .

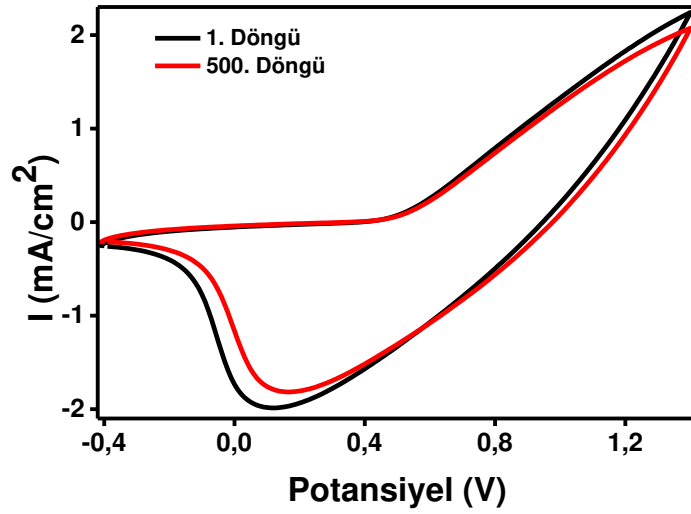


Şekil 5.2 CH-P(M1) için (a) farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri, (b) Katodik ve anodik pik potansiyellerinin akıma göre değişimi, monomersiz 0,1 M LiClO₄/ACN ortamında

Başlangıç oksidasyon potansiyelinden faydalanılarak kompozit filmin HOMO ve LUMO değerleri sırasıyla 5,51 eV ve -3,49 eV olarak hesaplanmıştır.

5.1.3 CH-P(M1)'nin Kararlılığı

Elektrot yüzeyinde iletken polimerin uzun süre redoks aktiviteye maruz kaldığında optik ve elektriksel özelliklerinde kayıpların olmaması beklenir. İletken polimerin optik ve elektriksel özelliklerindeki kayıpların başlıca nedeni sürekli uygulanan potansiyel farklarından ve çevresel faktörlerden redoks aktif merkezlerdeki (polaron ve bipolaron) kusurlar veya bozulmalardır. CV iletken polimerlerin uzun vadeli kararlılığını yorumlayabilmek ve saptayabilmek için oldukça önemli ve pratik bir tekniktir. CV çalışmaları atmosferik şartlar altında, oda sıcaklığında, 250 mV/s tarama hızında ve -0,4 V ile 1,4 V potansiyel aralığında 500 döngü yapılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.3'te gösterildiği gibi 500 döngü sonunda % 6'lık bir değişim gösteren CH-P(M1) kompozit malzemesi kararlı bir yapıya sahiptir.

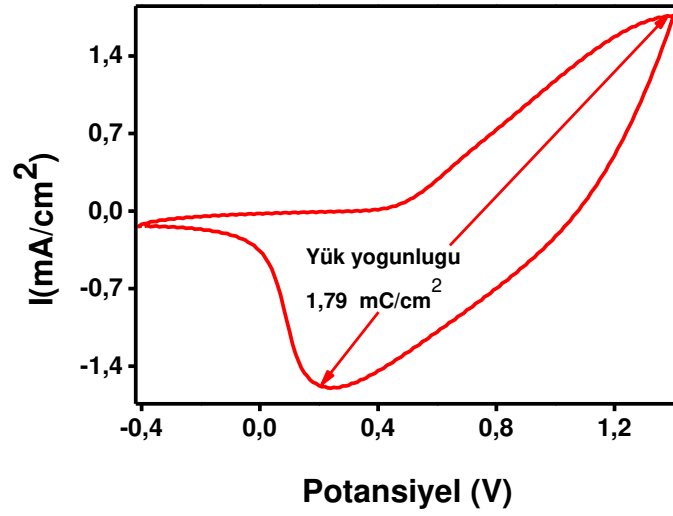


Şekil 5.3 CH-P(M1) için 250mV/s tarama hızında monomersiz 0,1 M LiClO₄/ACN ortamında 1. ve 500. dönüşümlü voltamogramlar

5.1.4 CH-p(M1) Kompoziti İçin Yük Yoğunluğu

Bir, iki ya da üç boyutlu bir uzayın birim hacmi başına elektrik yükünün ölçülmesine yük yoğunluğu (Current Density - CD) denir. Elektrokimyada ise yüzey alanı başına iki durum arasında (katkılanmış ya da katkılanmamış) iyon aktarımı için gerekli elektrik yükünün bir miktarına yük yoğunluğu denir (Ayrancı vd., 2017)

CH ile modifiye edilmiş ITO cam elektrotun yüzeyinde sentezlenen P(M1)'nın yük yoğunluğunu araştırmak amacıyla monomersiz 0,1 M LiClO₄/ACN destek elektrolit-çözücü içeren çalışma hücresinde 250 mV/s tarama hızında test yapılmıştır. CH-P(M1)'nın yük yoğunluğu CV grafiğinin yükseltgenme eğrisinin altında kalan alanın integrali vasıtasıyla belirlenmiştir. Şekil 5.4'de CH-P(M1)'nın yük yoğunluğu gösterilmiştir ve 1,79 mC/cm²'dir.



Şekil 5.4 CH-P(M1) için 500 mV/s tarama hızında 0,1 M LiClO₄/ACN ortamında yük yoğunluğunu göstermek için alınmış dönüşümlü voltamogram

Tablo 5.1’de ilgili literatüre dayanılarak P(M1) için ve deneyler sonucunda elde edilen verilere göre CH-P(M1) için $E_{onset,ox}$, stabilite ve yük yoğunluğu (CD) değerleri özetle ve karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Kompozit için başlangıç oksidasyon potansiyeli sadece iletken polimere göre daha büyüktür. Ayrıca kompozitin P(M1)’ya göre daha stabil olduğu tespit edilmiş ve buna karşın yük yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir.

Tablo 5.1 P(M1) ve CH-P(M1) için $E_{onset,ox}$, Stabilite ve CD değerleri

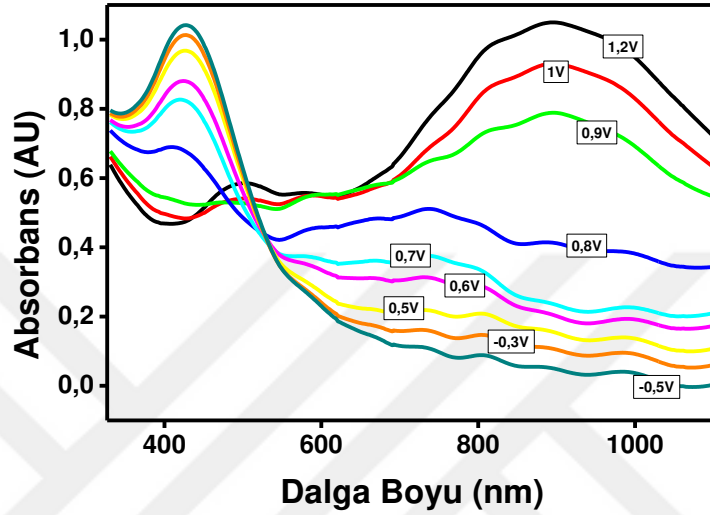
Malzeme	$E_{onset,ox}(V)$	Stabilite (%)	CD (mC/cm ²)
P(M1) ^a	0,6	79	2,17
CH-P(M1)	0,76	94	1,79

^a(Soğancı, 2017)

5.1.5 CH-p(M1)’nın Spektroelektrokimyasal Özellikleri

Uygulanan voltaj değişimine bağlı olarak konjuge polimerlerin optik ve elektrokimyasal özelliklerini araştırmak için Spektroelektrokimya tekniği kullanılmaktadır. Spektroelektrokimya tekniği ile sentezlenen polimerin uygulanan potansiyeldeki optik özellikleri ve elektronik geçişleri gibi hususları araştırmak mümkündür. Bu çalışmalar daha önce ITO yüzeyinde sentezlenen polimerin belirli potansiyellerde monomer içermeyen destek elektrolit çözücü ortamında spektrumunun alınmasıyla gerçekleştirilmiştir.

CH ile modifiye edilmiş ITO elektrotu yüzeyi 30 sn boyunca 1,4 V 'da 0,2 M M1 içeren LiClO₄/ACN hücresinde P(M1) ile kaplanmıştır. Ardından monomer içermeyen elektrolit/çözücü ortamında 250 mV/s tarama hızında -0,5 V ile 1,2 V potansiyelleri arasında CH-P(M1)'nın UV spektrumları test edilmiştir. Uygulanan her potansiyel için dalga boyuna karşılık absorbans değişimi grafik ile gösterilmiştir (Şekil 5.5).



Şekil 5.5 Uygulanan farklı potansiyellerde, 0,1 M LiClO₄/ACN ortamında CH-P(M1) kompoziti için UV-vis spektrumları

Genel olarak valans bandından iletim bandına elektron geçişini ifade eden UV bölgesindeki absorpsiyon spektrumu P(M1) (Soganci vd., 2017) ve CH-P(M1) (Şekil 5.5) için benzerdir ve P(M1)'nın karakteristik özelliklerini taşımaktadır. HOMO-LUMO enerji seviyeleri arasındaki optik bant boşluğu enerjisi olarak ifade edilen E_g , $\pi-\pi^*$ geçişlerinin olduğu dalga boyundaki başlangıç (onset) enerji absorpsiyonundan faydalanılarak hesaplanmıştır. $\pi-\pi^*$ geçişlerinin olduğu dalga boyu CH-P(M1) için 427 nm olarak belirlenmiş ve bunlara bağlı olarak optik bant boşluk enerjisi (E_g) CH-P(M1) için 2,89 eV olarak belirlenmiştir. Uygulanan voltajın artmasıyla 900 nm de yük taşıyıcıların büyümesinden dolayı yeni absorpsiyon bandı (polaron-bipolaron geçişi) oluşumu gerçekleşmiştir.

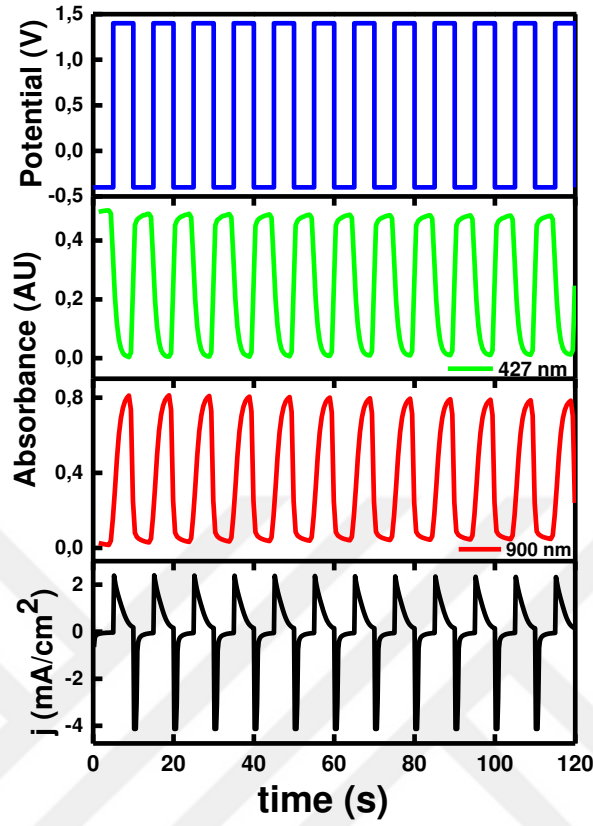
5.1.6 CH-P(M1) İçin Kinetik Çalışmaları

Elektrokimyasal uygulamalar için polimerin gözle görülür belirginlikte renk değişimi ve hızlı tepki verme yeteneğine sahip olması gerekir. Spektroelektrokimyasal testler sırasında elde edilen nötral durumda $\pi-\pi^*$ geçişlerinin meydana geldiği dalga boyunda, art arda tam

renkli ve renksiz durum arasındaki geçişler ve tekrarlanan döngüler sırasındaki renksiz olma /renklenme prosesini anlayabilmek için kinetik çalışmalar yapılmış ve CH-P(M1)'nın elektrokromik tepki süresi bu çalışmalar vasıtasıyla en yüksek ve en düşük geçiş değerleri yardımıyla tespit edilmiştir. Kompozit malzemenin tepki süresi (switching time) ve optik kontrastı (ΔT %) en yüksek dalga boyunda (λ_{max}), monomersiz LiClO₄/ACN çözeltisi içerisinde ve UV-vis spektrofotometresi ile yapılan testlerle belirlenmiştir.

Kinetik çalışmaları için CH modifiyeli ITO elektrot yüzeyi 1,2 V'da P(M1) ile kaplanmış ve monomer içermeyen çözücü/destek elektrolit ortamında 427 nm ve 900 nm'de 5'er sn aralıklarla -0,5 V (nötral durum) ile 1,2 V (yükseltgenmiş durum) arasında değişen bir potansiyel uygulanarak deneyler yapılmıştır (Şekil 5.6). Buna göre CH-P(M1) için 427 nm'deki optik kontrastı 25% ve tepki süresi 2,8 s olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 900 nm'deki optik kontrastı ve tepki süresi ise % 81 ve 1,6s olarak tespit edilmiştir.

Tablo 5.2'de P(M1) ve CH-P(M1) ile ilgili optik ve elektrokimyasal veriler verilmiştir. Bu veriler karşılaştırıldığında kompozitin başlangıç oksidasyon potansiyelinin P(M1)'ya göre yüksek olduğu görülür. Maksimum dalga boyları çok yakın olmasına karşın kompozitin bant boşluk enerjisinin daha yüksek olduğu gözlenmektedir. P(M1)'nın optik kontrastı kompozite göre daha iyidir ve tepki süresi daha kısadır. Sonuç olarak yalıtkan özelliğe sahip CH iletken polimerin onset potansiyelini ve bant boşluğu enerjisini yükseltirken oluşan kompozit yapıda iletken polimerim konjuge çift bağlar arasında oluşan p-yığılaşmasını engelleyerek iyonik geçirgenliğini kolaylaştırarak optik kontrast ve tepki zamanını iyi yönde geliştirmiştir.



Şekil 5.6 CH-P(M1) için 0,1 M LiClO₄/ACN destek elektrolit çözümü sisteminde, 427 ve 900 nm’de Absorbans-Zaman grafikleri

Tablo 5.2 P(M1) ve CH-P(M1) için optik ve elektrokimyasal veriler

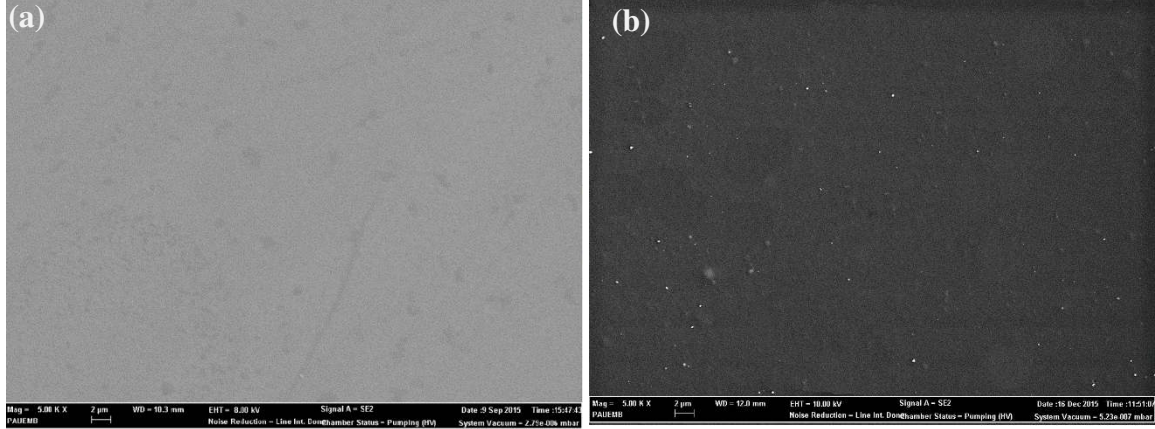
Malzeme	E _{onset,ox} (V)	λ _{max} (nm)	E _g ^{op} (bandgap) (eV)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Optik Zıtlık (%ΔT)	Tepki Süresi (s)
P(M1) ^a	0,6	850	2,26	-4,31	-2,05	90	2,5
CH-P(M1)	0,74	900	2,89	-5,49	-3,43	81	1,6

^a (Soğanacı, 2017)

5.1.7 Yüzey Karakterizasyonu

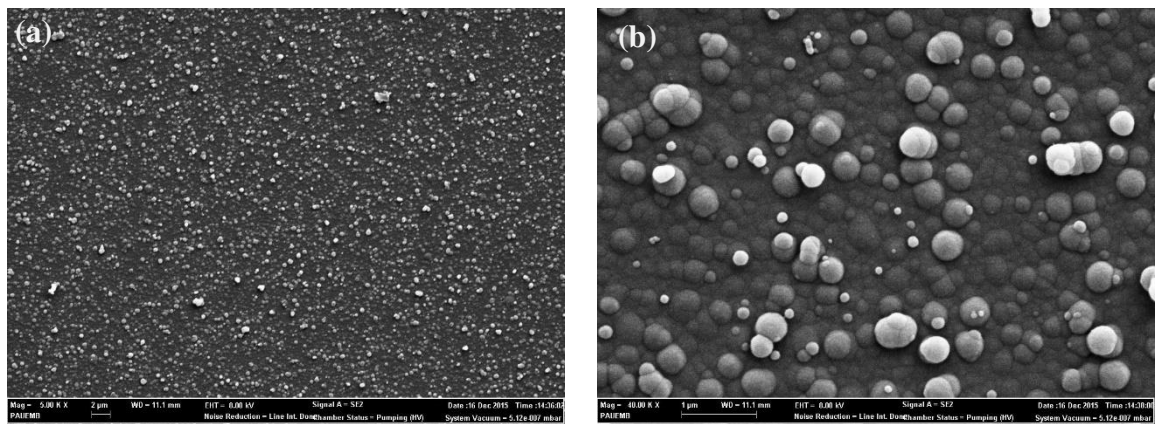
Hazırlanan kompozitin ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde analizini yapmak amacıyla SEM kullanılmıştır. Şekil 5.7 (a)’da hazırlanan diğer yüzeyleri karşılaştırmalı olarak karakterize edebilmek için yüzeyi herhangi bir malzeme ile kaplanmamış ITO kaplı cam elektrot kullanılmıştır. Boş ITO yüzeyi homojen ve düz bir görünüme sahiptir. (Şekil 5.7 (b)). CH

modifiyeli elektrot yüzeyi sadece 5000 büyütmeye kadar görüntülenebilmiştir ve daha detaylı görüntüleme bir biyopolimer olan kitosanın bozulması sebebiyle mümkün değildir.



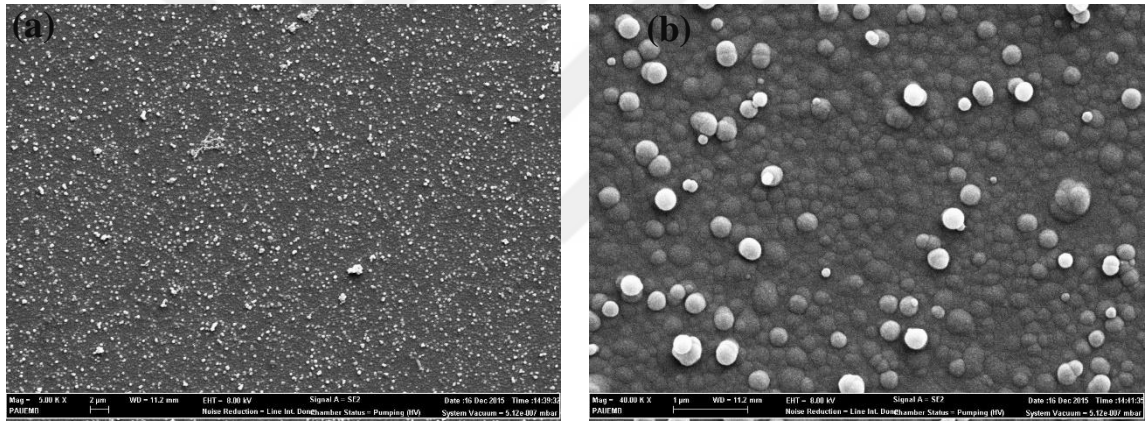
Şekil 5.7 a) 5000 kez büyütülmüş boş ITO cam elektrot b) 5000 kez büyütülmüş 15 µl CH ile modifiye edilmiş ITO cam elektrot için SEM fotoğrafları

ITO elektrot yüzeyinin 0,1 M LiClO₄/ACN ortamında, sabit 1,2 V potansiyelde 30 sn boyunca M1'nin elektropolimerizasyonu sonucunda kaplanmasının ardından SEM ile karakterizasyonu yapılmıştır. Şekil 5.8 (a) ve (b)'de P(M1) kaplı ITO elektrot yüzeyinin sırasıyla 5000 kez büyütme ile alınmış SEM fotoğrafları görülmektedir. İletken polimer kaplı elektrot yüzeyinin boş elektrottan ve CH modifiyeli elektrottan oldukça farklı olduğu görülmektedir. P(M1) kaplı elektrot yüzeyinde kabarcık şeklinde taneler görülmektedir yani P(M1) pürüzlü ve tanecikli bir görünüme sahiptir.



Şekil 5.8 Elektrokimyasal olarak P(M1) ile kaplanmış ITO elektrot yüzeyi için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 40000 kez büyütülmüş SEM fotoğrafları

CH-P(M1)'yı ITO elektrot yüzeyinde karakterize etmek için CH ile modifiye edilmiş ITO elektrotu 0,1 M LiClO₄/ACN ortamında, sabit 1,2 V potansiyelde ve 30 sn boyunca M1 monomerinin elektropolimerizasyonu ile kaplanmıştır. Hazırlanan bu elektrotun Şekil 5.9 (a) ve (b)'de sırasıyla 5000 kez ve 40000 kez büyütme ile alınmış SEM fotoğrafları gösterilmiştir. CH-P(M1) ile kaplanmış elektrot yüzeyinin sadece P(M1) ile kaplanmış elektrot yüzeyi ile benzer olduğu görülmektedir. Ancak kompozit kaplı elektrot yüzeyinin daha düz ve taneciklerin daha homojen olduğu görülmektedir. Yüzey görüntülerinin benzer olması CH katmanının PM1 katmanının ITO elektrodu arasında bağlayıcı modifiye yüzey oluşturarak ve PM1 için plastikleştirici etki yaparak stabilitesini artırırken yüzey özelliklerinde çok büyük bir farklılığa neden olmamaktadır. Yüzey özelliklerindeki çok az değişiklik bile SEM fotoğrafları yüzeyde kompozit oluşumunu kanıtlamaktadır.



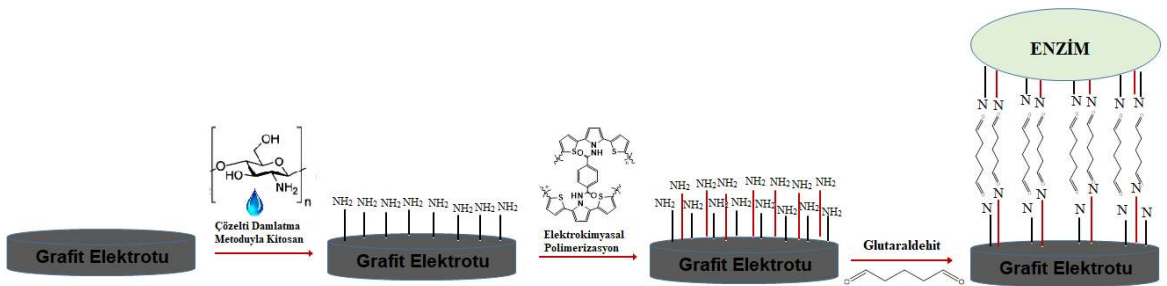
Şekil 5.9 CH-P(M1) ile kaplanmış ITO elektrot yüzeyi için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 40000 kez büyütülmüş SEM fotoğrafları

5.2 CH-P(M1) Kompozit Filminin Biyosensör Özellikleri

Biyomolekül temelli deteksiyon teknolojileri gıda/içecek endüstrileri, hastalıkların teşhisi, biyoproseslerin görüntülenmesi ve çevresel kirliliklerin taranması gibi çeşitli uygulamalar için dikkat çeken bir potansiyele sahip olduklarından birçok güncel araştırmanın odak noktası haline gelmiştir (David vd., 2018) (Li, Hu, Li, & Yao, 2017). Biyomolekül immobilizasyonu için dönüştürücü yüzeyinin modifikasyonu ve farklı gereksinimler için biyosensörün stabilitesini arttırmak biyosensör çalışmalarının temel noktasıdır. Kitosan gibi doğal polimerler, sol-jel metodu ve iletken polimerler gibi farklı stratejiler immobilizasyon platformu oluşturmak için kullanılırlar (Dervisevic vd., 2017) . Kitosan sahip olduğu aktif

gruplar, iyi film oluşturma özelliği ve biyoyumluluğu gibi üstün özellikleri sebebiyle biyosensör için immobilizasyon platformu oluşturmak için en çok kullanılan malzemedir. Bunun yanında iletken polimerlerin (elektrokimyasal polimerizasyon ile) homojen film oluşturabilme özellikleri, stabil olmaları, biyoyumlu olmaları, kolay üretilebilir olmaları ve etkin elektron transfer yetenekleri sebebiyle biyosensör tasarımında yaygın bir biçimde kullanılmaktadırlar. Bu tezin ilk kısmında N¹,N⁴-bis (2,5-di (tiyofen-2-yl) -1H-pirol-1-yl) tereftalamid p(M1) elektroaktif monomerin kitosan ile kompoziti yapılarak glikoz için biyosensör immobilizasyon platformu oluşturulmuştur. Kitosan ve iletken polimer kullanılarak biyomolekül (enzim) ve polimer immobilizasyon platformu arasında oluşacak güçlü bağlar vasıtasıyla kararlı ve stabil bir biyolojik tanılama platformu oluşturmak amaçlanmıştır. Tezin en önemli çıktılarından birisi çok kolay bir yöntemle kitosan/iletken polimer kompozitinin hazırlanarak iletken polimerlerin optik ve elektriksel özelliklerinin yanında stabilitesinin önemli ölçüde artırılmasıdır.

Şekil 5.10'da CH-P(M1) kompoziti ile grafit çalışma elektrotu yüzeyinde oluşturulan glikoz oksidaz enzim immobilizasyon platformunun aşamaları gösterilmiştir. Grafit elektrot yüzeyi enzimi yüzeye tutuklayabilmek için aktif NH₂ gruplarına sahip biyo uyumlu bir biyo polimer olan kitosan ile kaplanmıştır. Elektron alışverişini kolaylaştırmak, sensörden elde edilecek sinyal gücünü arttırmak ve sensörün daha stabil olmasını sağlamak amacıyla yüzey iletken polimer P(M1) ile elektrokimyasal yolla kaplanmıştır. P(M1) iletken olmasının yanında NH₂ gruplarına sahiptir. Yani P(M1) elektrot yüzeyindeki elektron transferini kolaylaştırmanın yanında immobilizasyon işleminde de görev almaktadır.



Şekil 5.10 Biyosensör elektrotunun üretimi

M1 monomeri elektrokimyasal olarak CH ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyinde polimerleştirilmiştir. Bu işlem 0,05 M M1 ve 0,1 M LiClO₄/ACN içeren bir hücrede grafit

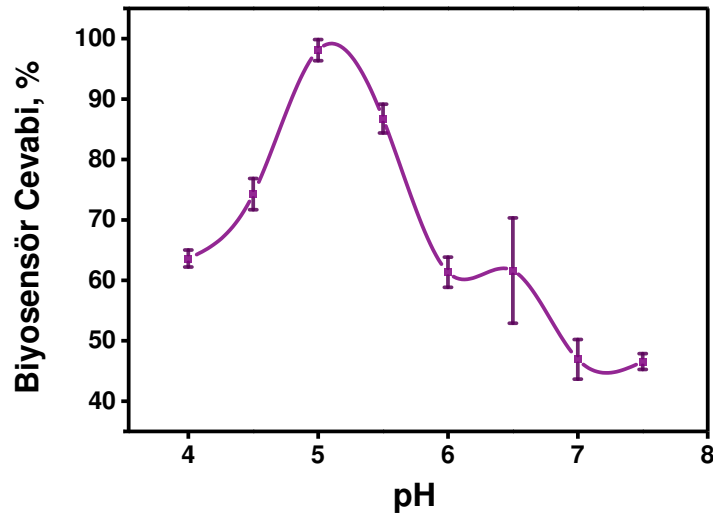
elektrot yüzeyi 30 s boyunca sabit 1,4 V potansiyel ile elektrokimyasal olarak kaplanarak gerçekleştirilmiştir.

Biyosensörün çalışma prensibi ortamda glikoz bulunduğu durumda enzimin katalitik aktivitesine bağlı olarak tüketilen oksijen miktarının hesaplanmasına dayanır. Enzimin yüzeye kovalent olarak bağlanması için iki fonksiyonlu çapraz bağlayıcı glutaraldehit kullanılmıştır. Glutaraldehit enzim ve CH-P(M1)'nın amin grupları arasında kovalent bağlanmanın gerçekleşmesi için çapraz bağlayıcı görevi görür.

5.2.1 CH-P(M1)-GOx Glikoz Biyosensörü için Optimizasyon

Doğru pH değerinde çalışmak biyosensörün enzim aktivitesini veya hazırlanan yüzeye biyosensörün cevabını izlemek için oldukça önemlidir. Biyosensör fabrikasyonunda pozitif veya negatif yüklü grupları içeren immobilizasyon matrisinin durumu kullanılacak tampon çözeltinin pH'ına etki eder. Bu nedenle biyosensör çalışmalarında kullanılacak tampon çözeltinin optimum pH değerinin hazırlanan biyosensöre özgün olarak tespit edilmesi oldukça önemlidir. Buna bağlı olarak CH-p(M1) glikoz biyosensörünün çalışma koşullarını belirlemek amacıyla pH optimizasyonu yapılmıştır. Böylece hazırlanan biyosensör için en uygun pH değeri tespit edilmiştir yapılan diğer testlerde bu pH değerine sahip tampon çözeltide gerçekleştirilmiştir.

pH değeri 4 ve 7,5 arasında değişen 8 tampon çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu tampon çözelti ortamında biyosensör cevapları karşılaştırılmıştır. Bu amaçla 10 ml tampon çözelti içeren 3 elektrotlu amperometrik test hücresi hazırlanmış ve akım stabil olana kadar beklenmiştir. Kararlı bir akım elde edildiğinde ortama 25 µl 0,1 M'lık glikoz çözeltisinden eklenmiş ve elde edilen akım farkı kaydedilmiştir. Çeşitli pH değerleri için biyosensörün nispi cevabı Şekil 5.11'de gösterilmiştir. Maksimum cevap pH 5 değerinde elde edilmiştir. Biyosensör fabrikasyonunda kullanılan negatif veya pozitif yüklü gruplar içeren immobilizasyon matrisi çalışma hücresinde kullanılacak olan tampon çözeltinin pH değeri önemli ölçüde sensör cevaplarına etki edebilmektedir. Dolayısıyla optimum pH değeri biyosensör fabrikasyonunda kritik bir yere sahiptir.



Şekil 5.11 CH-P(M1) biyosensörü üzerinde pH etkisi (0,1 M sodyum fosfat tamponu içerisinde, -0,7V)

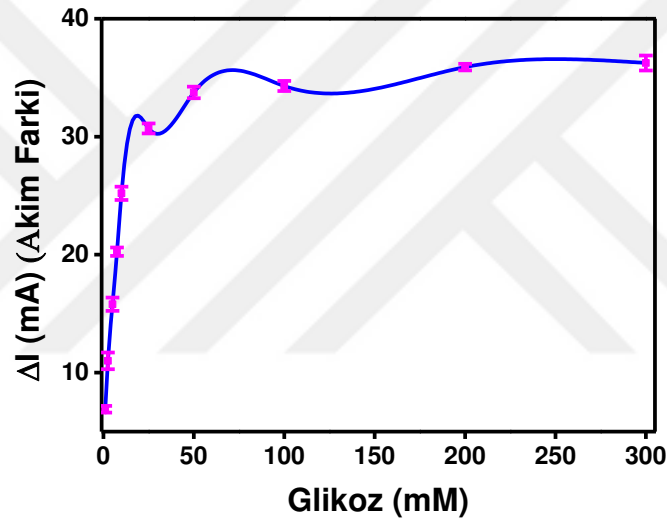
Elektrot yüzeyi 10 µl CH ile modifiye edildikten sonra 1,4 V sabit potansiyelde, pH 5 de 10 s, 20 s, 30 s, 40 s süreyle elektrokimyasal olarak P(M1) ile kaplanarak hazırlanan sensör elektrotunun cevabı araştırılmıştır (Tablo 5.3). 30 saniyenin altında ve üstünde yapılan elektrokimyasal polimerizasyon işlemleri ile üretilen elektrotların cevabının düşük olduğu gözlenmiştir. En yüksek sensör cevabı ise 30 s süreyle P(M1) ile kaplanmış elektrottan elde edilmiştir. Elektrot yüzeyi düşük sürelerde kaplandığında yani yüzeyde daha ince bir iletken polimer tabakası oluşturulduğunda yüzeyde elektron iletimini sağlayacak yeterli iletken polimer bulunmamasından ve elektrot yüzeyindeki fonksiyonel grupların azalmasından dolayı sensör cevabı da düşük olabilir. Bunun yanında elektrot yüzeyinde çok fazla iletken polimer biriktirildiğinde ve nispeten daha kalın bir iletken polimer tabakası oluşturulduğunda yüzeyde bir difüzyon bariyeri oluşmasından kaynaklanan bu daha düşük yük taşıma oranı sensör cevabının düşük olmasına sebep olabilmektedir. Özetle bu deneyde P(M1)'nin film kalınlığı polimerleşme süresi ile kontrol edilerek en yüksek sensör cevabının alındığı film kalınlığı optimize edilmiştir. Sonuçlar Tablo 5.3'de özetlenmiştir.

Tablo 5.3 1,4 V sabit potansiyelde elektropolimerizasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Polimerizasyon Süresi (s)	Sensör Cevabı	Standart Sapma
10	16,12	0,7502
20	21,9	0,52915
30	30,8	0,45826
40	16,4	0,60696

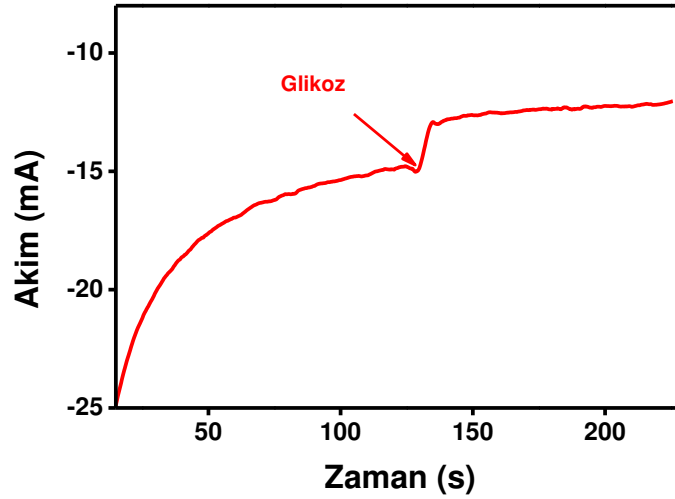
5.2.2 CH-P(M1)-GOx Glikoz Biyosensörü için Kalibrasyon Çalışmaları

Biyosensör cevabının glikoz konsantrasyonuna bağlılığını araştırmak amacıyla pH 5'te 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde sabit -0,7 V potansiyelde farklı konsantrasyonlardaki glikoz çözeltileri ile testler gerçekleştirilmiştir. Glikoz konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen akım değerleri kalibrasyon grafiğinde (Şekil 5.12) gösterilmiştir. 1 mM'dan 300 mM'a kadar olan glikoz konsantrasyonları için sensörün verdiği cevap (akım farkı (mA)) değerleri tespit edilmiştir. 25 mM' kadar olan glikoz konsantrasyonlarında akım farkı sürekli artarken 25 mM'dan sonra akım farkı yaklaşık olarak sabit kalmıştır.



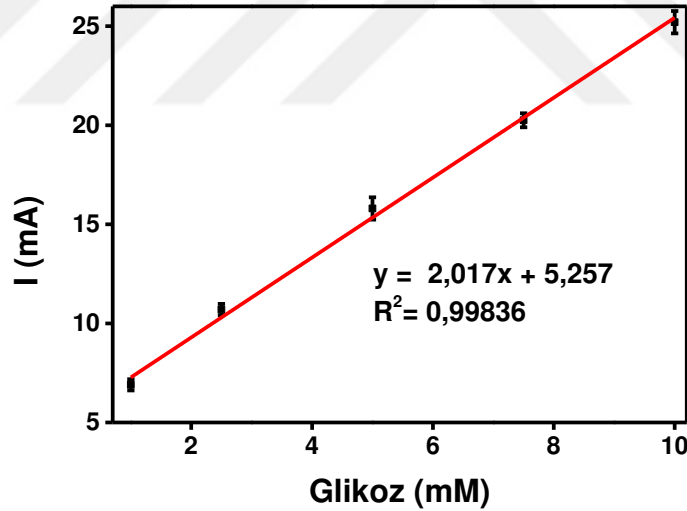
Şekil 5.12 CH-P(M1) enzim elektrotu için kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,0, -0,7V). Hata çubukları üç ölçüm sonucunda elde edilen standart sapmayı gösterir.

Şekil 5.13 ortama 25 mM glikoz eklendikten sonra zamana bağlı olarak akım değişimini göstermektedir. CH-P(M1) biyosensörü için amperometrik bütün deneyler 0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, Ph 5'de ve -0,7 V sabit potansiyelde gerçekleştirilmiş ve buradan elde edilen veriler yorumlanmıştır.



Şekil 5.13 Çalışma hücresine 25 mM glikoz eklendikten sonra akımın zamana bağlı olarak değişimi (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, Ph 5, -0,7 V)

CH-P(M1) biyosensörü için lineerlik limiti 10 mM'dır ve lineerlik 1 mM ve 10 mM arasındadır elde edilmiştir (Şekil 5.14). Biyosensör cevabı (y) ve analit konsantrasyonu (x) arasındaki lineer kalibrasyon grafiğine ait eşitlik $y = 2,017x + 5,287$ şeklindedir.



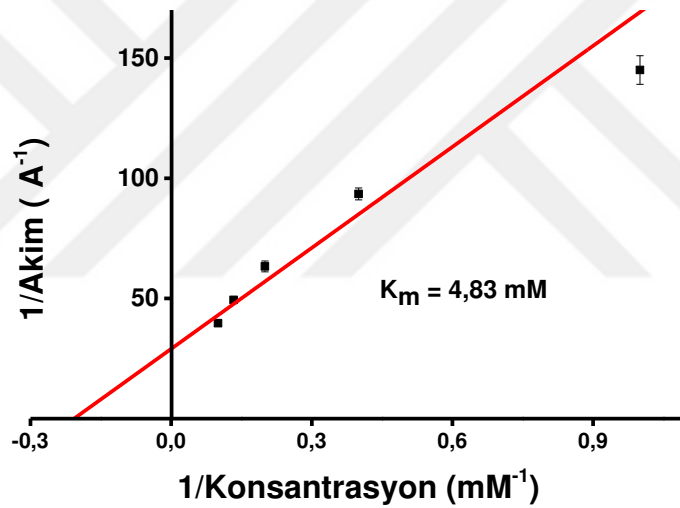
Şekil 5.14 CH-P(M1) biyosensörü için lineer kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,0, -0,7V).

Ticari amaçlı kandaki şeker tespiti amacıyla kullanımda lineerlik sınırı vücuttaki glikoz konsantrasyonu olan 15 mM' dır (Harper, 2005). Bunun yanında literatürdeki diğer çalışmalarla kıyaslandığında CH-P(M1) biyosensörünün lineerlik sınırı oldukça iyidir. Ayrıca artan glikoz miktarına karşı CH-P(M1)'nın verdiği lineer sürekli hal cevabı etkili bir glikoz oksidasyonu meydana geldiğini göstermektedir. CH-P(M1) biyosensörü lineerlik

sınırı 15 mM'ın altında olduğu için pratik canlı içi (in vivo) kullanım için yeterince uygun değildir.

Gözlenebilme sınırı (LOD) farklı biyosensörleri karşılaştırmak için iyi bir metottur. Önceki bölümde anlatıldığı gibi CH-P(M1) lineer kalibrasyon grafiğinden (Şekil 5.14) faydalanılarak LOD değeri 0,48 mM olarak belirlenmiştir.

Glikozun oksidasyonu sonucu meydana gelen reaksiyon GOx enziminin katalizörlüğü eşliğinde gerçekleşmektedir. Reaksiyonun kinetiği hakkında yorum yapabilmek için Michaelis-Menten sabiti K_m değeri Lineweaver–Burke grafiği (Şekil 5.15) yardımı ile 4,83 mM olarak tespit edilmiştir. K_m değerinin küçük olması GOx enzimi tarafından glikozun daha iyi okside olduğunu ve reaksiyonun hızının iyi olduğunu gösterir.

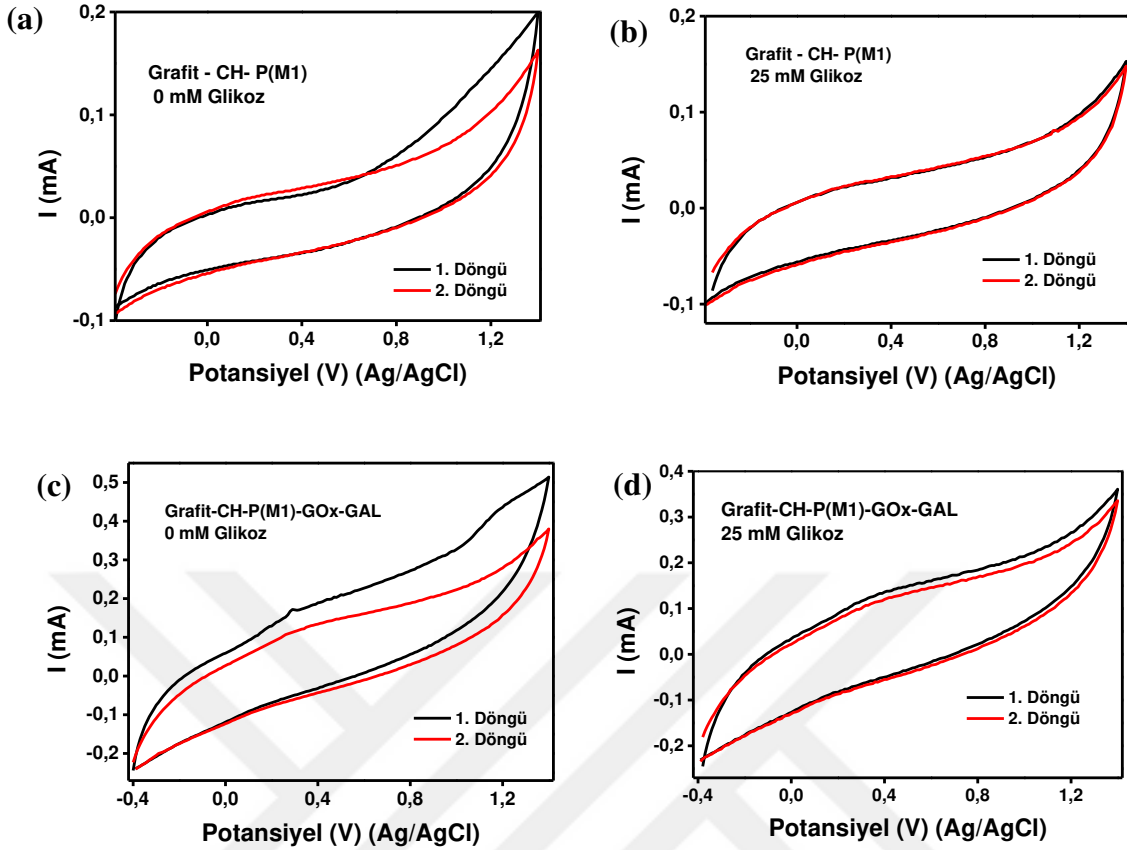


Şekil 5.15 CH-P(M1) enzim elektrotu için Lineweaver–Burke grafiği

5.2.3 CH-P(M1)-GOx Glikoz Biyosensörü ile Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

Dönüşümlü voltametri tekniği sensör elektrotunun tabakalarının birleşmesini ve glikozun GOx enzimi tarafından oksidasyonunu takip etmek amacıyla kullanılmıştır. CV testleri elektrot çalışma 0,1M sodyum fosfat içeren pH'ı 5 olan çalışma hücresinde 5 dk bekletildikten sonra önce glikozsuz ortamda yapılmıştır. Ardından çalışma hücreesine 25 mM glikoz enjekte edilip ve 1dk karıştırıldıktan sonra CV testleri yapılmıştır. Bütün testler grafit çalışma elektrotu ile 0,025 V/s tarama hızında, sodyum fosfat tamponu içerisinde, pH 5'te gerçekleştirilmiştir. CV çalışmaları -0,4 V ile 1,4 V aralığında gerçekleştirilmiştir.

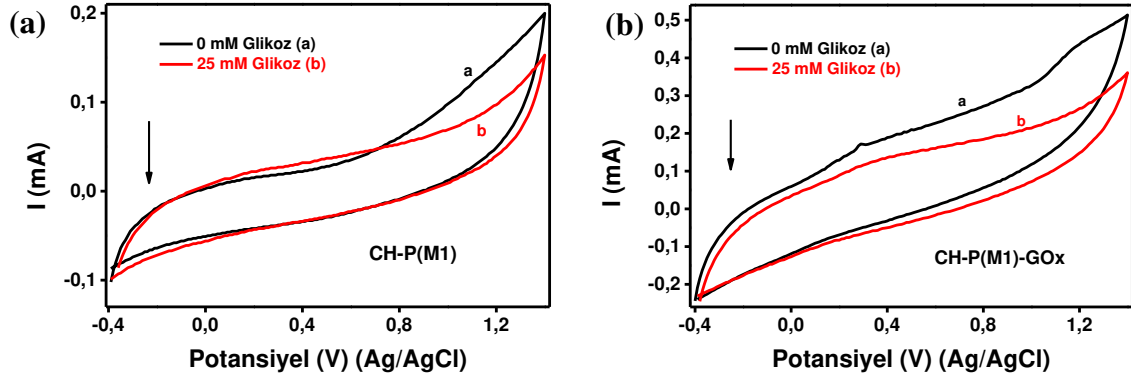
Şekil 5.16 (a) ve (b)'de CH-P(M1) çalışma elektrotu ile $Ag^+/AgCl$ referans elektrotuna karşı çalışma hücresine glikoz eklenmeden ve eklenerek yapılan dönüşümlü voltametri çalışmaları gösterilmiştir. CV grafiğinde çalışma hücresine glikoz eklenmeden önce ikinci döngünün düşme eğilimi gösterdiği görülmektedir (Şekil 5.16 (a)). Ancak ortama glikoz eklendikten sonra bu düşüş olmamış ve her iki döngü sabit kalmıştır (Şekil 5.16 (b)). Şekil 5.16 (c) ve (d)'de ise CH-P(M1)-GOx-GAL çalışma elektrotu için CV çalışmaları glikozlu ve glikozsuz çalışma ortamında gerçekleştirilmiştir. Burada ikinci döngüde diğer glikozsuz CV çalışmasına nazaran daha güçlü bir düşüş meydana gelmiştir (Şekil 5.16 (c)). Ancak ortama glikoz eklenerek yapılan CV çalışmalarında bu düşüş gözlenmemiş ve iki döngü hemen hemen sabit kalmıştır (Şekil 5.16 (d)). Glikoz eklendiği ortamda ikinci döngüde düşüşün ya hiç olmaması ya da çok az olması glikozun destek elektrolit gibi davranıyor olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca Şekil 5.16 'da (a) ve (c) grafikleri kıyaslandığında enzim immobilize edilmiş elektrotun diğer elektrotun yaklaşık iki katı bir akım değerine ulaştığı görülmektedir. Şekil 5.16 (b) ve (d) grafikleri kıyaslandığında ise ortama glikoz eklendiğinde genel olarak her iki elektrot için bir akım düşüşünün meydana geldiği ancak ilk döngüyü izleyen ikinci döngünün yaklaşık olarak aynı kaldığı ve değişmediği gözlenmiştir.



Şekil 5.16 Grafit elektrot yüzeyine (a) CH-P(M1) ile kaplanıp glikoz eklenmeden, (b) CH-P(M1) ile kaplanıp çalışma hücresine 25 mM glikoz eklenerek, (c) CH-P(M1)-GOx-GAL ile kaplanıp glikoz eklenmeden, (d) CH-P(M1)-GOx-GAL ile kaplanıp çalışma hücresine 25 mM glikoz eklenerek yapılan CV çalışmaları (0,1M sodyum fosfat içerisinde, pH 5, tarama hızı 0,025 V/s, Ag/AgCl referans elektrotuna karşı, -0,4 V ve 1,4 V aralığında)

-0,4 ve 1,4 V potansiyel aralığında enzim immobilize edilmiş ve edilmemiş çalışma elektrotlarının glikoza verdikleri tepki araştırılmıştır. CV testler pH'ı 5 olan 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içeren hücrede $Ag^+/AgCl$ referans elektrotuna karşı gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.17 (a)'da ve (b)'de sırasıyla CH-P(M1) çalışma elektrotu ile glikozsuz ve 25 mM glikoz içeren çalışma hücresinde CV çalışmaları yapılmıştır. CH-P(M1) glikoz bulunmayan ortamda 0,2 mA akım değerine ulaşırken glikoz enjekte edildikten sonra ancak 0,15 mA akım değerine ulaşabilmiştir. Çalışma elektrotuna enzim immobilize edildikten sonra çalışma hücresinde glikoz bulunmadan ve 25 mM glikoz enjekte edilerek CV çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.17 (c) ve (d)). Enzim elektrotu ile yapılan CV testlerinde hücrede glikoz bulunmadığında ve 25 mM glikoz bulunduğunda sırasıyla 0,51 ve 0,36 mA akım değerlerine ulaşmıştır. Hem enzim elektrotu ile hem de enzim immobilize edilmemiş elektrot ile yapılan çalışmalarda ortama glikoz eklendiğinde akım değerlerinin düştüğü gözlenmiştir. Ayrıca enzim elektrotunun enzim bulunmayan elektrota göre daha

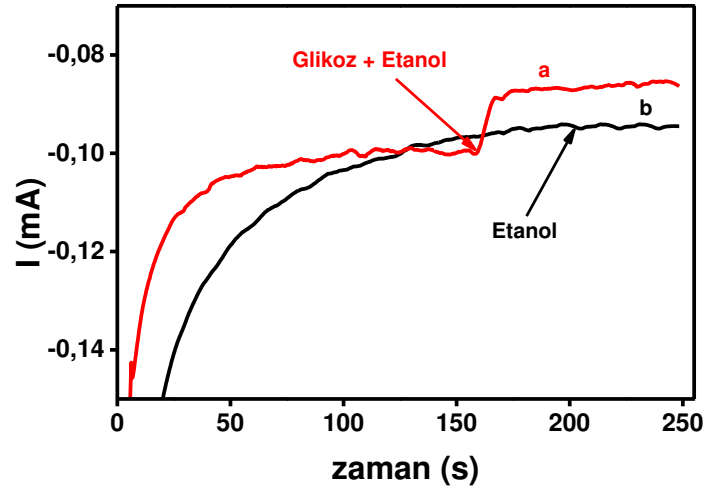
yüksek akım değerine ulaştığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra ortama glikoz eklendiğinde meydana gelen akım düşüşü enzim elektrotu için daha fazladır.



Şekil 5.17 Grafit elektrot yüzeyine (a) CH-P(M1) ile kaplanıp, (b) CH-P(M1)-GOx-GAL ile kaplanıp çalışma hücresine glikoz eklenmeden ve 25 mM glikoz eklenerek yapılan CV çalışmaları (0,1M sodyum fosfat içerisinde, pH 5, tarama hızı 0,025 V/s, Ag/AgCl referans elektrotuna karşı)

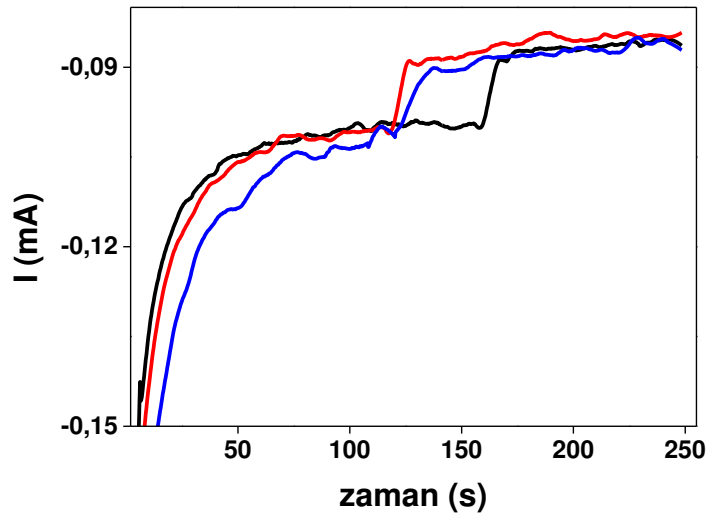
5.2.4 CH-P(M1)-GOx Glikoz Biyosensörüne Girişimci Etkisi

Biyosensörün seçiciliği ortama eklenecek girişimci maddelere karşı sensörün cevabı araştırılarak yapılmıştır. Biyosensör çalışma hücresine glikoz olmadan ve glikoz ile birlikte etanol enjekte edilmiş ve sensörün verdiği cevap incelenmiştir. Şekil 5.18’de çalışma hücresine aynı anda 0,1 M’lık etanol çözeltisinden 5 mM glikoz çözeltisinden eşit miktarda (5 μ l) (a eğrisi) ve sadece etanol (0,1M ve 5 mM) (b eğrisi) enjekte edildiğinde CH-P(M1) glikoz enzim sensörünün verdiği cevap gösterilmiştir. Grafikte de gösterildiği gibi ortamda etanol bulunduğunda ve bulunmadığında sensör cevabı değişmemiştir. Yani etanolün CH-P(M1) glikoz biyosensörü üzerinde girişimci etkisi yoktur.



Şekil 5.18 CH-P(M1)-GOx glikoz biyosensörüne ortamdaki girişimci etkisi (pH 5, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda)

Yapılan testlerin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla girişimci testi aynı şartlar altında 3 kez tekrarlanmıştır. Glikoz ve etanol birlikte enjekte edildiğinde sensörün cevabı $15,45 \text{ mA} \pm 0,52$ 'dir (üç tekrar için) ve bu daha önce aynı şartlarda biyosensörün sadece glikoz için verdiği cevap ile aynıdır. Yani biyosensörün etanol varlığında bile glikozu karşı seçiciliği oldukça iyidir.



Şekil 5.19 CH-P(M1)-GOx glikoz biyosensörünün etanol + glikoz enjeksiyonuna verdiği cevap (3 tekrar, pH 5, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda)

5.2.5 CH-P(M1)-GOx Glikoz Biyosensörü ile Gerçek Örneklerde Glikoz Tayini

CH-P(M1)-GOx glikoz biyosensörü ile üç farklı ticari içecekteki glikoz miktarı başarılı olarak tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır (Tablo 5.4). Testler pH 5’de sodyum fosfat tamponu içerisinde yapılmıştır. Spektrofotometrik testler ile elde edilen sonuçlar CH-P(M1)-GOx glikoz biyosensörü kullanılarak elde edilen sonuçlar ile iyi bir biçimde uyuşmaktadır ve bu hazırlanan biyosensörün pratikteki glikoz tayini uygulamaları için potansiyelinin oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

Tablo 5.4 CH-p(M1) biyosensörü kullanarak ve spektrofotometrik yöntemi kullanarak içecekler içerisindeki toplam glikoz miktarının saptanması sonuçları

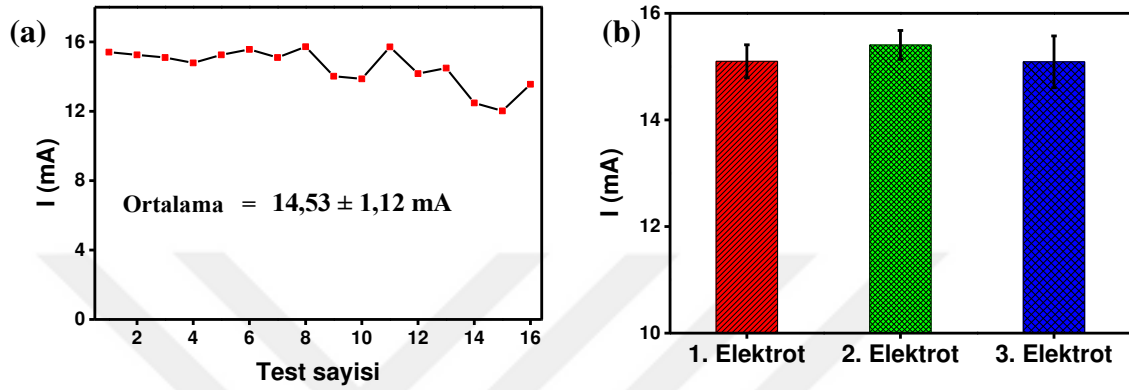
Numune	Glikoz(mM)*		
	CH-p(M1)	Spektrofotometrik	Benzerlik %
Kola	4,98 ± 0,08	5,05 ± 0,007	101
Meyve suyu	6,13 ± 0,16	5,92 ± 0,002	97
Gazoz	2,56 ± 0,12	2,66 ± 0,001	104

*Sonuçlar en az üç testin ortalamasıdır ± standart sapmadır.

5.2.6 CH-P(M1)-GOx Biyoelektrotunun Stabilitesi

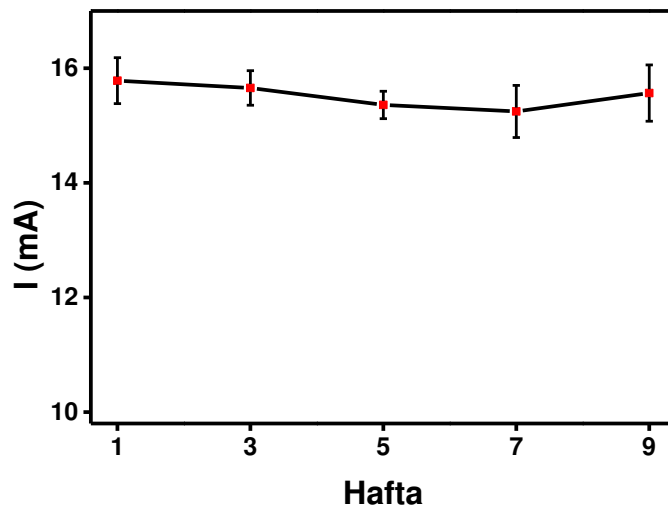
Hazırlanan CH-P(M1)-GOx biyoelektrotu ile elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olup olmadığını araştırmak için öncelikle aynı elektrot ile 0,1 M sodyum fosfat tamponu içeren ve pH’ı 5 olan hücrede 16 test yapılmıştır (Şekil 5.21 (a)). Biyosensörün bu testler sonucunda verdiği cevabın ortalaması $14,53 \pm 1,12$ mA olmuştur. Art arda yapılan bu testlerde on birinci denemeden sonra cevaptaki sapmaların arttığı yani elektrotun yorulduğu gözlenmiştir. Ancak biyoelektrot çalışma tampon çözeltisi içerisinde yarım saat bekletildikten sonra cevaplar yine stabil olmuştur. Bunun yanında tek bir elektrot ile en az 50 test yapılabilmiştir. Hazırlanan biyosensör elektrotunun tekrarlanabilirliğini araştırmak için hazırlanan üç elektrot ile çalışma hücresine 5 mM glikoz eklenerek sensörün cevabı izlenmiş ve yaklaşık olarak her üç elektrottan aynı cevaplar alınmıştır (Şekil 5.21 (b)). Bu sonuca göre aynı şartlarda hazırlanan CH-P(M1)-GOx enzim platformlarının eklenen glikoz’a karşı aynı cevapları verdiği yani tekrar kalibrasyona gerek duymayan oldukça kararlı ve sürekli enzim platformlarının hazırlanabileceğini göstermiştir. Literatürde

genellikle hazırlanan her elektrot için farklı kalibrasyon hazırlanması gerektiğinden CH-P(M1)-GOx enzim platformlarının ticari uygulamalar için oldukça stabil sonuçlar verdiği görülmektedir. Sonuç olarak kitosan içeren P(M1) enzim platformundan oldukça stabil ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir. Bu enzim platformunun farklı enzim ve substratlar için stabil ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebileceğini göstermektedir.



Şekil 5.20 CH-P(M1)-GOx için (a) Biyoelektrotun art arda yapılan testlere verdiği cevap, (b) Tekrarlanabilirlik (Çalışma hüresine 5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 5’de)

Çalışmalarda kullanılan elektrotlardan biri çalışma tampon çözeltisi içerisinde (pH 5, sodyum fosfat tamponu) ve 4 °C ‘de saklanmış ve 2 hafta aralıklarla test edilmiştir (Şekil 5.21). Dokuzuncu hafta sonunda biyosensör elektrotunun hala aynı kararlılıkta çalıştığı gözlenmiştir. Bu sonuç enzim platformunun raf ömrünün oldukça iyi olduğunu ve ticari uygulamalar için oldukça elverişli olduğunu göstermektedir.



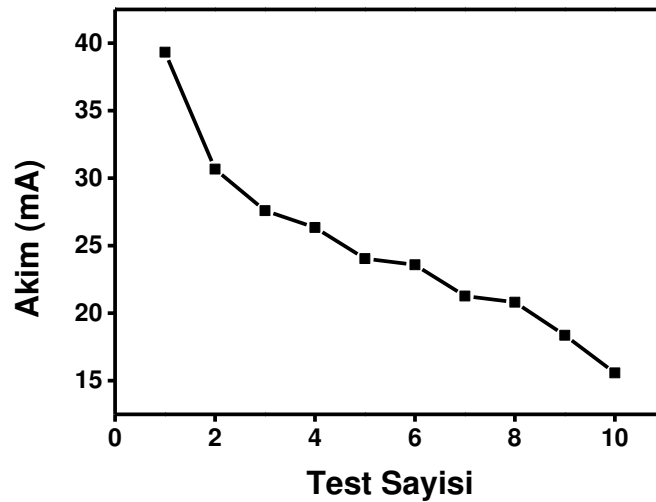
Şekil 5.21 CH-P(M1)-GOx için Stabilité çalışması (5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 5’de)

Tablo 5.5’de CH, P(M1) ve CH-P(M1) ile oluşturulan GOx immobilizasyon platformlarının glikoza verdikleri cevaplar gösterilmiştir. Yalnız CH’nin (24,76 mA) ve yalnız P(M1)’nin verdiği cevabın (14,8 mA) toplamı CH-P(M1)’nin verdiği cevaptan yüksektir. Bu da hazırlanan kompozit bileşenlerinin biyosensör uygulamaları için sinerjik bir etki yaptığını göstermektedir. Kompozit yapı içerisindeki kitosan üzerindeki amin grupları ile enzimin stabil bir şekilde immobilize edilmesini sağlarken iletken polimer için de plastikleştirici etki ile iyon geçişini dolayısıyla elektriksel özelliklerini arttırarak biyokimyasal reaksiyon sonucundaki akım farklılığının artmasına sebep olmaktadır.

Tablo 5.5 CH, P(M1) ve CH-P(M1) enzim immobilizasyon platformları (n = test sayısı)

İmmobilizasyon Platformu	Biyosensör Cevabı	Standart Sapma
CH-GOx-GAL	24,76	$\pm 6,77$ (n=10)
P(M1)-GOx-GAL	14,8	$\pm 0,9$ (n=4)
CH-P(M1)-GOx-GAL	30,7	$\pm 0,4$ (n=10)

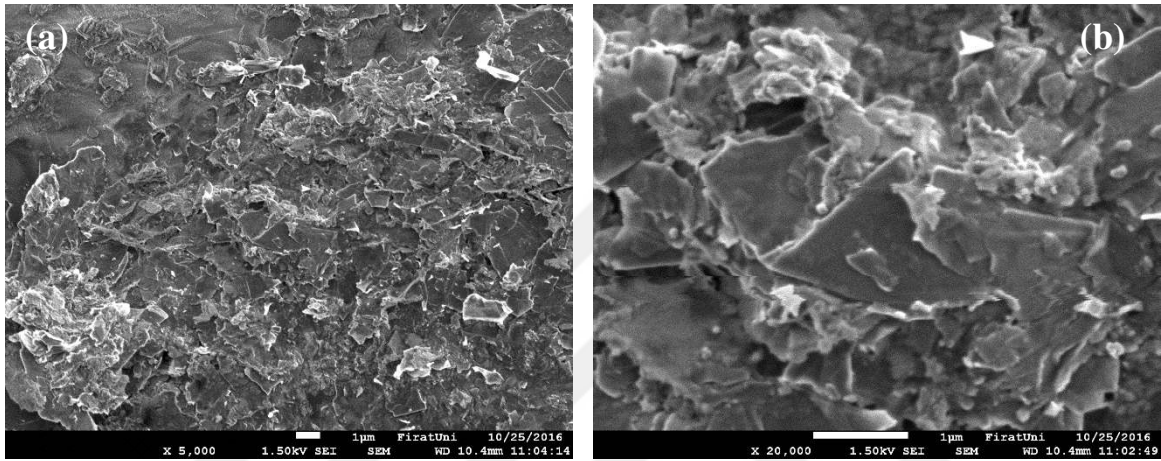
CH-GOx-GAL glikoz biyosensörünün 10 test sonucunda kararsız bir biçimde cevap verdiği ve bozulduğu gözlenmiştir (Şekil 5.22). CH ile hazırlanan enzim elektrotunun stabilitesi düşüktür ve çalışmalar sürerken sensör cevabı sürekli azalmıştır İlk ölçüm (39,33 mA) ile son ölçüm (15,57 mA) arasında %60’lık bir fark vardır. Buna göre iletken polimerler ile yapılan kompozitlerin enzim immobilizasyonu için daha elverişli olduğu ve iletken polimerlerin biyoelektrotun stabilitesini arttırdığı söylenebilir.



Şekil 5.22 CH-GOx glikoz biyosensörünün art arda yapılan testlere verdiği cevaplar

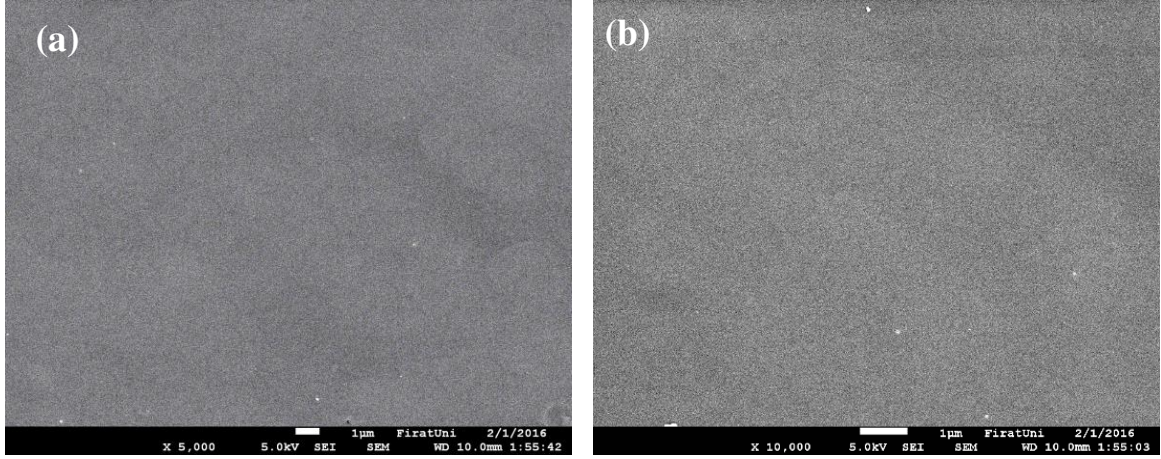
5.2.7 Grafit Elektrotu Yüzeyinde Morfolojik Araştırmalar

Hazırlanan biyoelektrotun morfolojik yapısı her bir aşama için adım adım SEM ile yapılmıştır. Biyosensör çalışmalarında grafit elektrot kullanıldığı için ilk olarak grafit elektrotun parlatılmış ve temizlenmiş haldeki yapısı incelenmiştir. Boş grafit elektrotun taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiş yüzeyi Şekil 5.23 (a) ve (b)'de gösterilmiştir.



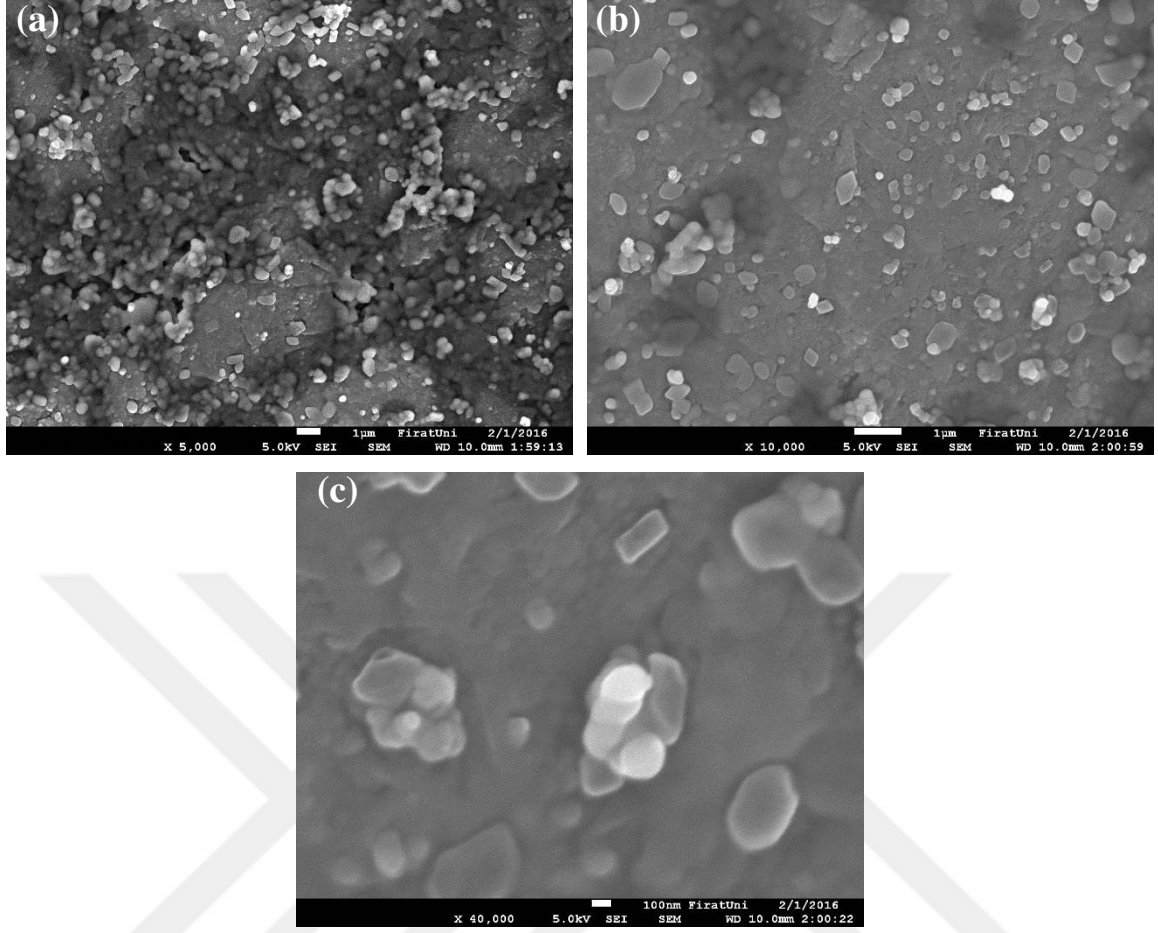
Şekil 5.23 Boş grafit elektrot için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

Grafit üzerinde biyosensör katmanları oluşturmaya kitosan ile başlanmıştır. Önceki bölümde anlatılmış olan prosedüre göre grafitin yüzeyi CH ile kaplanmış ve bu yüzeyi karakterize etmek için SEM fotoğrafları alınmıştır. Şekil 5.24 (a)'da 5000 kez büyütülmüş (b)'de 10000 kez büyütülmüş ve (c)'de 10000 kez büyütülmüş CH kaplı elektrot yüzeyi görülmektedir. CH elektrot yüzeyini bir örtü gibi kaplamış ve pürüzsüz ve düz bir görünüm kazandırmıştır. Her iki fotoğrafta benzer yapı görülmektedir. CH bir biyo malzemedir ve görüntü almak için gönderilen elektronlar yapısına arar vermektedir. Bu nedenle büyütme oranı arttıkça SEM ile görüntü alımı zorlaşmakta ve yüzeydeki CH gözle görünür bir biçimde bozunup yanmaktadır. Bu neden en fazla grafit elektrotu üzerinde CH'nin 10000 büyütmeye kadar olan görüntüleri alınabilmektedir. Şekilde de görüleceği gibi 10000 büyütmede yüzeyde çatlaklar ve bozulmalar oluşmuştur.



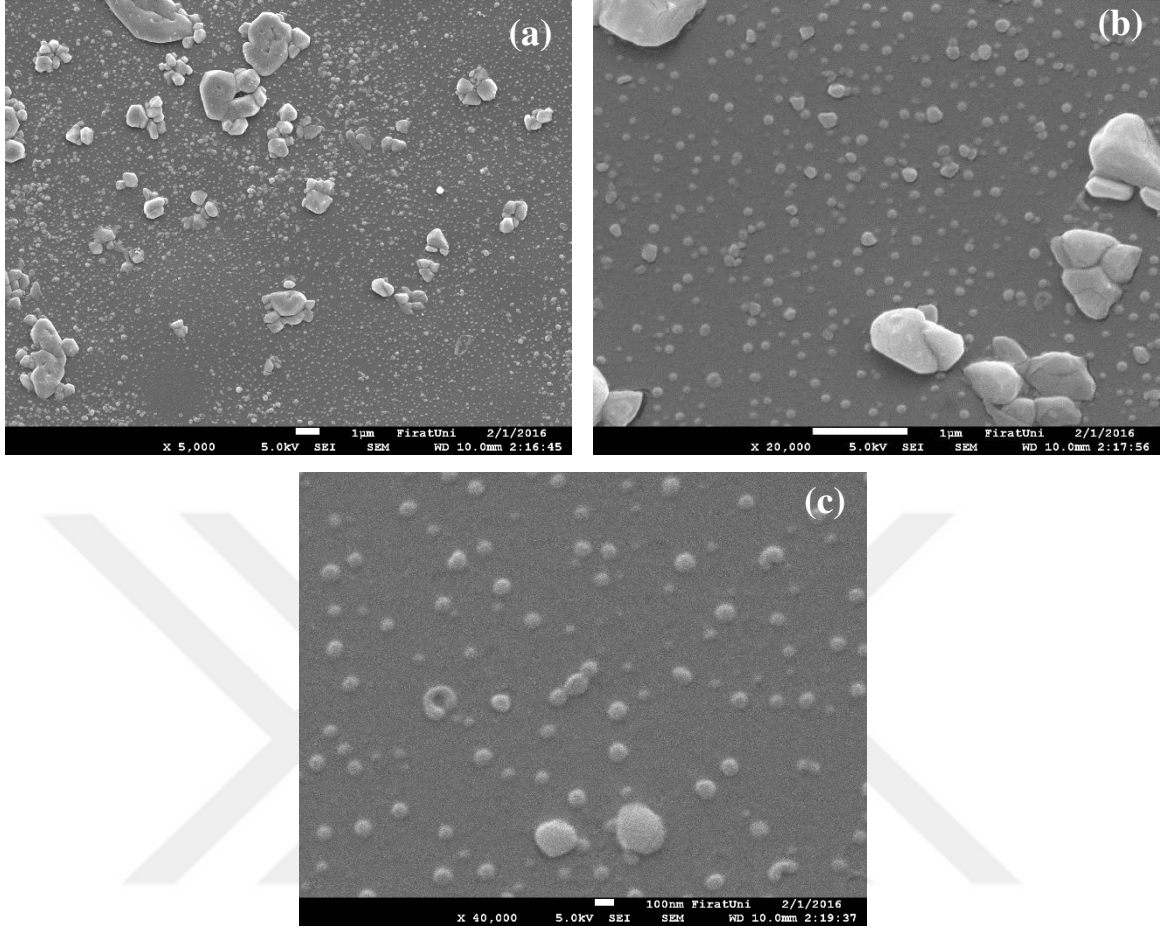
Şekil 5.24 CH ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 10000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

Biyoelektrot hazırlanmadan önce sadece P(M1)'nin grafit elektrotu yüzeyindeki morfolojisini karakterize etmek için ayrıca SEM görüntüleri alınmıştır. Böylece adım adım yüzeyde meydana gelen yapısal değişiklikler daha açık bir biçimde gözlenmiştir. Şekil 5.25'de P(M1) ile elektrokimyasal olarak kaplanmış grafit elektrotunun farklı büyütme oranları için SEM fotoğrafları gösterilmiştir. 5000 kez büyütülmüş resimde (Şekil 5.25 (a)) yüzeyde birikmiş olan P(M1) tanecikleri görülmektedir ve yüzeyde pürüzlü ve tanecikli bir yapı oluşmuştur. Ayrıca P(M1) tanecikleri kendi arasındaki π - π etkileşimlerinden dolayı kümelenmiş yoğun polimer birikintileri oluşturmuşlardır. Şekil 5.25 (b) ve (c)'de ise sırasıyla 10000 ve 40000 kez büyütülerek alınmış SEM fotoğrafları gösterilmiştir ve bu fotoğraflarda daha küçük alanlarda oluşan iletken polimer birikintileri açıkça görülmektedir.



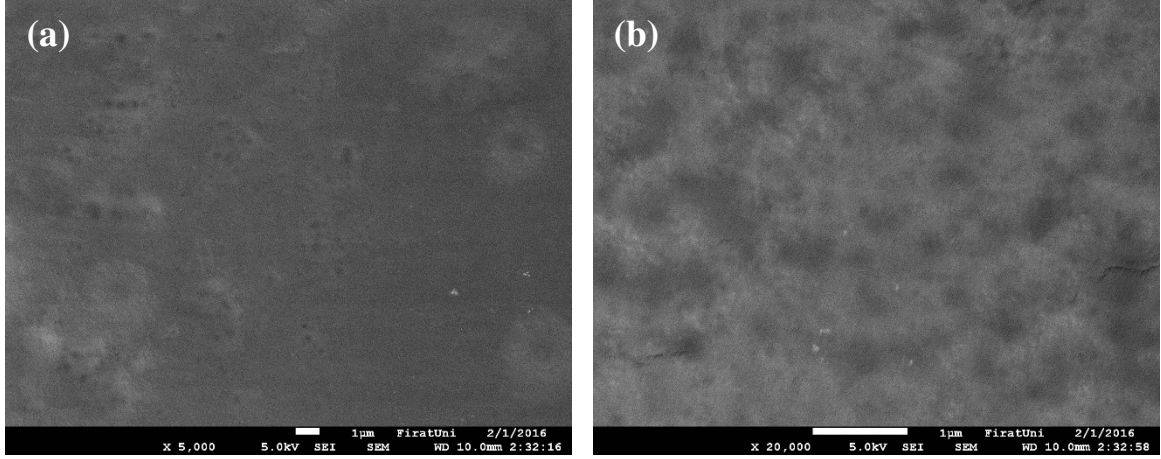
Şekil 5.25 P(M1) ile elektrokimyasal yolla kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 10000 kez büyütülmüş, (c) 40000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

Grafit elektrot yüzeyi önce damlatma yoluyla CH ile kaplanmış ve ardından elektrokimyasal olarak P(M1) ile kaplanmıştır. Grafit elektrot yüzeyinde elde edilen bu biyoiletken-kompozit malzemenin Şekil 5.26 (a), (b) ve (c)'de sırasıyla 5000, 10000 ve 40000 kez büyütme için alınmış SEM görüntüleri verilmiştir. Elektrotun tabanında sadece CH ile kaplanmış elektrotla benzer olarak pürüzsüz ve düz bir yapı vardır. Buna karşı sadece P(M1) ile kaplı elektrotun tabanında grafitin tabanına benzer düz olmayan bir yapı da mevcuttur. Kitosanın ardından elektrot yüzeyi P(M1) ile kaplandığı her üç şekilde de açıkça görülmektedir. Ancak yüzeydeki CH'nin iletken olmayan karakteri P(M1)'nin yüzeyde birikintiler oluşturmaya engel olmuştur. Yüzeyde iletken polimerin çok fazla birikmesi kitosanın aktif merkezlerini kapatacağından enzim immobilizasyonunun etkin bir biçimde gerçekleştirilmesine engel olacaktır. Bu nedenle film kalınlığının elektrokimyasal yolla ayarlanabiliyor olması çok büyük bir avantaj sağlayarak biyosensör uygulamalar için en uygun film kalınlığının belirlenebilmiştir.



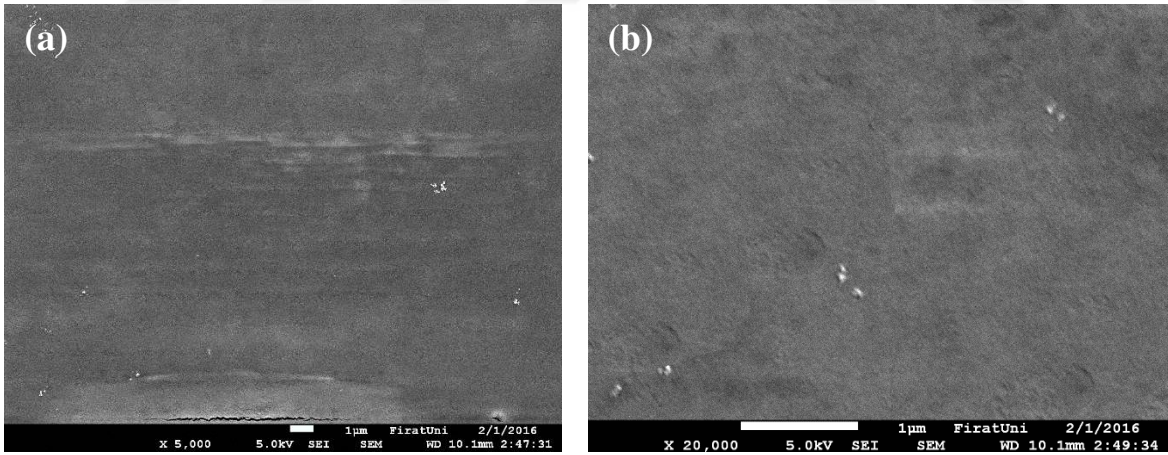
Şekil 5.26 CH-P(M1) ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 10000 kez büyütülmüş, (c) 40000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

CH yüzeyine glutaraldehit (GAL) aracılığıyla GOx enzimi immobilize edildikten sonra SEM görüntüleri alınarak elektrotun morfolojik özellikleri karakterize edilmiştir (Şekil 5.27 (a) ve (b)). CH ve GOx biyolojik malzemelerdir ve SEM ile görüntülemeye yüksek oranlardaki büyültmelerde yüzey elektron bombardımanı sonucu yanmaktadır. Bu nedenle en fazla 20000 kez büyültme yapılarak elektrot yüzeyi görüntülenmiştir. Enzim yüzeye uniform bir biçimde dağıtıldıktan sonra CH-P(M1) kompoziti ile amid bağları oluşturur ve bundan dolayı Şekil 5.27(b)'de görüldüğü gibi sarmal görünümlü bir düzen oluşmuştur.



Şekil 5.27 CH-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

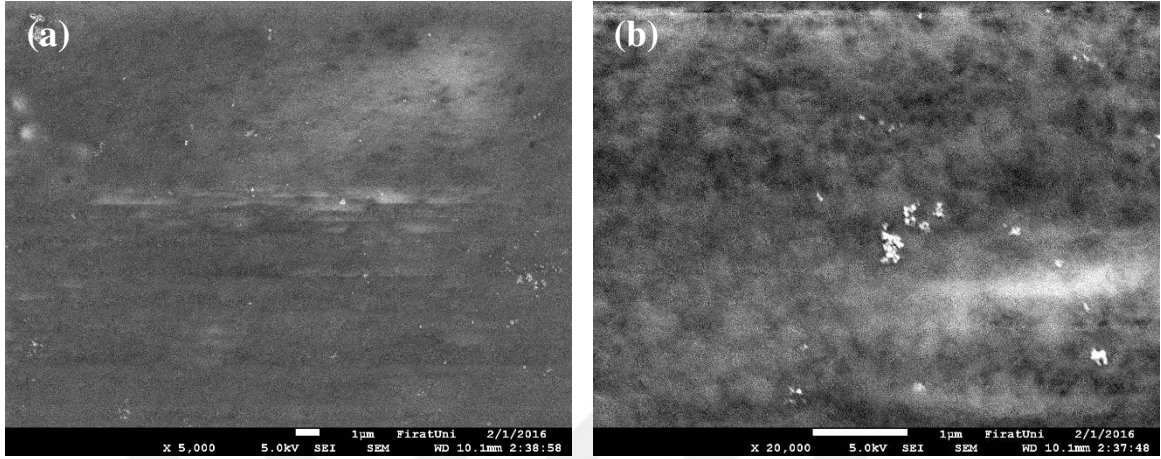
Grafit elektrot yüzeyine sadece P(M1) kaplanıp ardından GOx enzimi immobilize edildikten sonra SEM ile yüzey karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Şekil 5.28 (a) ve (b)'de sırasıyla 5000 ve 20000 kez büyütme yapılarak alınan SEM görüntüleri verilmiştir. İlk görüntüde yüzey uniform ve pürüzsüz görünürken 20000 büyültmede yüzeyde azda olsa sarmal görünümün olduğu gözlenir. Bun göre yüzeyde P(M1)'nın amin grupları ile enzim arasında amid bağları oluşmuştur.



Şekil 5.28 P(M1)-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

Bu çalışmada hedeflenen grafit elektrot yüzeyinde CH-P(M1) enzim immobilizasyon platformu oluşturup bu yüzeye enzim immobilize edip sensör olabilme özelliklerini araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan CH-P(M1)-GOx-GAL biyoelektrotunun yüzeyi SEM çalışmaları ile karakterize edilmiştir (Şekil 5.29 (a) ve (b)). 5000 büyültmede yüzeye pürüzsüz görünürken, görüntü 20000 kez büyütüldüğünde yüzeyde yoğun bir biçimde sarmal bir düzenin olduğu gözlenir. Daha öncede belirtildiği gibi bu sarmal

görüntü enzim ve kompozit arasında amid bağlarının kurulmasından kaynaklanmaktadır. Bu, hedeflenen CH-P(M1) immobilizasyon platformu ile istenen glikoz biyosensörüne ulaşıldığının ve GOx enziminin yüzeye başarılı bir biçimde immobilize edildiğinin kanıtıdır.



Şekil 5.29 CH- P(M1)-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

6 KİTOSAN (CH) - N¹,N³,N⁵-TRİS(2,5-Dİ(TİYOFEN-2-YL)-1H-PIROL-1-YL)BENZEN-1,3,5-TRİKARBOKSAMİD (M2) KOMPOZİT FİLMİN HAZIRLANMASI SPEKTROELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİ VE GLİKOZ BİYSENSÖRÜ

Kitosan toksik olmayan ve geniş bir pH aralığı için stabil olan biyouyumlu bir polimerdir. Ayrıca mükemmel adsorpsiyon özelliğine sahiptir ve biyolojik olarak bozunabilir. Fizyolojik pH koşullarında $-NH_2$ gruplarının protonasyonu sebebiyle kitosan pozitif yüklüdür ve bundan dolayı biyoadhesiv olarak kullanılır. Ayrıca buna bağlı olarak enzimlerle elektrostatik ve kovalent olarak bağlanırlar (Thambidurai & Pandiselvi, 2018).

Konjuge polimerler π -elektronuna sahiptirler ve buna bağlı olarak elektriksel iletkenlik, yüksek elektron ilgisi, düşük iyonlaşma potansiyeli ve düşük enerjili optik geçişler gibi geleneksel polimerlerin sahip olmadığı özelliklere sahiptirler. İletken polimerlerin π -konjuge sistemleri tek ve çift bağlar ile polimer zinciri boyunca uzanırlar. İletken polimerler birçok pratik uygulamada ve akademik çalışmada sıkça kullanılırlar. Ayrıca istenen mekanik özellikleri ve kolay işlenebilme avantajlarının yanı sıra yarı iletkenlerin veya metallerin manyetik, elektriksel optik özelliklerini gösterirler. İletken polimerler bu üstün özellikleri sayesinde güneş pilleri, bataryalar, elektrokromik devreler, moleküler elektronik devreler ve sensörler gibi birçok uygulamada kullanılırlar. İletken polimerlerin heterojen yüzey etkileşimi kazandırmak için polimerin yüzeyi reaktif kimyasal gruplar ile (karboksil, $-COOH$; amin, $-NH_2$; ve hidroksil, $-OH$ gibi) fonksiyonel hale getirilmelidirler.

Bu çalışma çerçevesinde kullanılan ikinci elektroaktif monomer (Soğancı, 2017) N¹,N³,N⁵-tris(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)benzen-1,3,5-trikarboksamid (M2)'dir. CH-P(M2) kompoziti grafit üzerinde enzim immobilizasyon platformu oluşturmak için hazırlanmıştır.

6.1 M2 Monomerinin CH ile Modifiye Edilmiş ITO Elektrotu Üzerindeki Elektropolimerizasyonu, Elektrokimyasal ve Elektrokromik Özellikleri

M2 özellikleri oldukça iyi olan elektroaktif bir monomerdur ve ticari olarak mevcut değildir (Soğancı, 2017) . Şeffaf cam elektrot olan ITO kaplı cam elektrot ile etkin bir biçimde elektrokimyasal ve spektroeletrokimyasal çalışmalar yapılabilir.

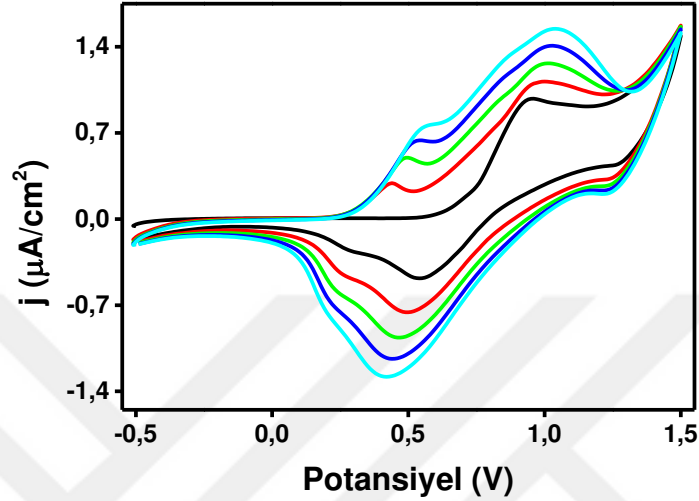
6.1.1 CH ile Modifiye Edilmiş ITO yüzeyinde M2 Monomerinin Elektropolimerizasyonu

Elektrokimyasal ve elektrokromik çalışmalar 0,1 M TBP6/DCM içeren bir çalışma hücresinde yapılmıştır. Bu elektrot yüzeyindeki M2'nin elektropolimerizasyonu ve oluşan kompozitin elektroaktivitesi dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile araştırılmıştır. Şekil 6.1'de CH-P(M2)'ya ait CV çalışması grafiği verilmiştir. CV grafiğinde ilk döngü monomerin elektropolimerizasyonuna aittir ve buradaki pik monomerin oksidasyonunu göstermektedir. Diğer döngülerde ise biri oluşan iletken polimere diğeri monomere ait olan iki yükseltgenme piki bulunmaktadır. Akım artışını izleyen ardışık döngüler monomerin ITO yüzeyine iyi bir biçimde yapıştığını gösterir. -0,5 V ile 1,5 V potansiyel aralığında yapılan testlerde tersinmez monomer oksidasyon piki CH modifiyeli ITO yüzeyinde 0,99 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ olarak ölçülmüştür. Oksidasyon pikinin büyüklüğü elektron yoğunluğu ile ilişkilidir.

P(M2) için monomerin başlangıç oksidasyon potansiyeli (onset potential) 0,58 V (Soğancı, 2017) iken CH-P(M2)'nın 0,66 V'dir. Bu durum ITO yüzeyindeki ince CH filminin iletken olmayan yapısından kaynaklanmaktadır ve CH filmi elektroaktif monomerin polimerleşmesini zorlaştırarak başlangıç oksidasyon potansiyelinin yükselmesine sebep olmuştur. Ancak buna rağmen monomerin polimerizasyonu gerçekleşmiş ve elektrot yüzeyinde elektrokimyasal yolla iletken polimer biriktirilerek istenen kompozit malzeme elde edilmiştir.

M2'nin elektropolimerizasyonu literatürde (Soğancı, 2017) ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ destek elektrolit/çözücü içeren bir elektrokimyasal hücrede yapılmıştır. Ancak CH ile modifiye edilmiş ITO elektrotu ile yapılan çalışmalarda $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ ortamında polimerizasyon gerçekleştirilememiş ve testler sonucunda elektrot

yüzeyinde P(M2) biriktirilememiştir. Bu nedenle LiClO₄/ACN sistemi yerine TBP6/DCM destek elektrolit/çözücü ortamında elektrokimyasal testler yapılmış ve polimerizasyonun gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu nedenle M2 monomeri ve P(M2) iletken polimeri ile ilgili yapılan tüm deneylerde TBP6/DCM içeren elektrokimyasal hücre kullanılmıştır.



Şekil 6.1 CH modifiyeli ITO kaplı cam elektrot üzerinde 0,05 M M2 için 250mV/s tarama hızında 0,1 M TBP6/DCM destek elektrolit çözücü sistemi için dönüşümlü voltamogramlar

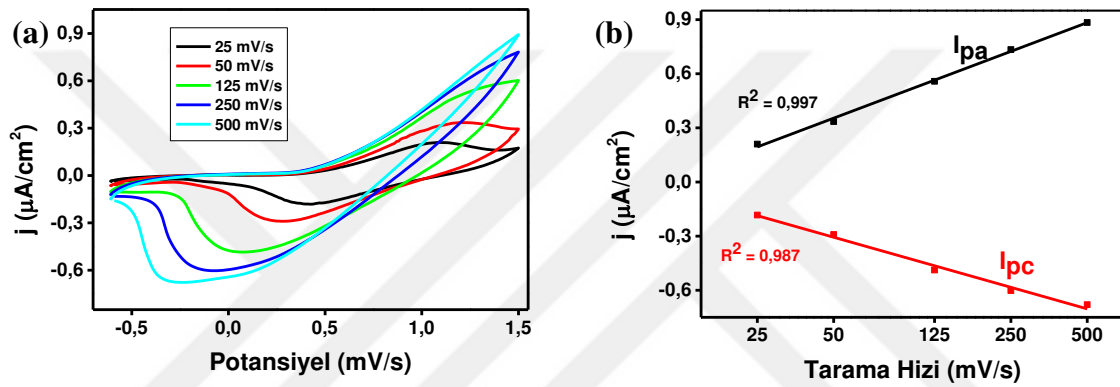
6.1.2 CH-P(M2)'nin Elektrokimyasal Özellikleri

CH-P(M2)'nin farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri tekniği ile elektrokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Bunun için öncelikle M2 monomeri 1,5 V sabit potansiyelde 0,1 M TBP6/DCM çözeltisinde CH ile kaplanmış ITO yüzeyinde elektrokimyasal yolla polimerleştirilmiştir. Ardından monomer içermeyen TBP6/DCM elektrolit çözücü çifti ortamında çeşitli tarama hızlarında dönüşümlü voltametri testleri yapılmıştır.

Şekil 6.2 (a)'da CH-P(M2) kompozitinin farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve Şekil 6.2 (b)'de ise Şekil 6.2 (a)' dan elde edilen veriler ışığında tarama hızının anodik ve katodik pik potansiyellerinde akım yoğunluğuna göre değişimleri gösterilmiştir. Randless-Sevcik eşitliğine dayanılarak dönüşümlü voltametride bir polimerleşme prosesinin difüzyona bağlılığı tespit edilmiştir. Elektrokimyasal deneylerde tarama hızı akım yoğunluğu ile orantılı ise bu proses difüzyondan bağımsızdır. $I_{pa}/I_{pc} \approx 1$ olması akım yoğunluğu ve tarama hızı arasında doğrusal bir orantı olduğuna ve prosesin difüzyon ile kontrol edilmediğine işaret eder. Buna göre CH-P(M2) için akım yoğunluğu ve

tarama hızı arasında doğru orantılı bir ilişki söz konusudur, polimerizasyon işlemi difüzyon kontrollü değildir ve oluşan polimer yüzeye stabil bir biçimde tutunmuştur. Ayrıca $I_{pa} \approx I_{pc}$ olması elektrokimyasal davranışların yarı tersinir olduğunu ve üretilen polimerin kimyasal olarak tersinir olduğunu ispatlar (Ayrancı, Soganci, vd., 2015) .

CH-P(M2) kompozitinin oksidasyon için gerekli potansiyel yüksek ve indirgenme için gerekli potansiyeli oldukça düşüktür. Yani CH-P(M2) kompozit filminin iletkenliği ve redoks aktivitesi oldukça düşük olduğundan her döngüde oksidasyon için daha fazla potansiyel ve redüksiyon için daha düşük potansiyel gereksinimi ortaya çıkmıştır.



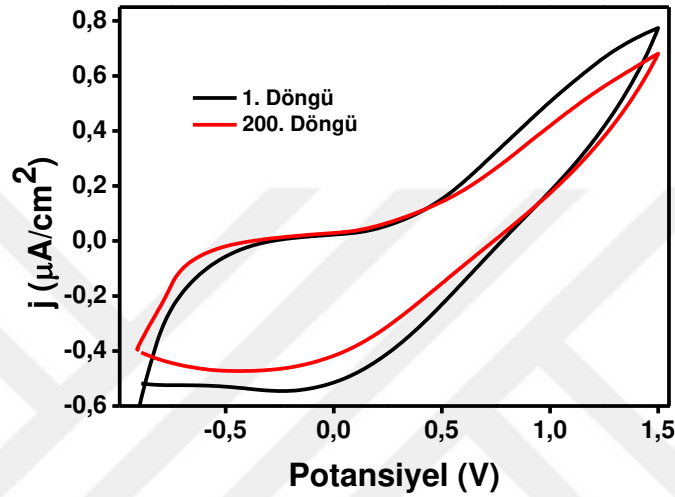
Şekil 6.2 CH-P(M2) için (a) farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri, (b) Katodik ve anodik pik potansiyellerinin akıma göre değişimi, monomersiz 0,1 M TBP6/DCM ortamında

Başlangıç oksidasyon potansiyelinden faydalanılarak kompozit filmin HOMO ve LUMO değerleri sırasıyla -5,41 eV ve -2,48 eV olarak hesaplanmıştır.

6.1.3 CH-P(M2) Kompoziti İçin Stabilité Çalışması

İletken polimer malzemelerin kararlılığı tersinir redoks reaksiyonunun stabilitesidir. Redoks stabilitesi elektrokimyasal kararlılıkla ilişkili olmakla birlikte elektrot yüzeyinde bulunan iletken polimerin özelliklerini kaybetmeden işlevine devam ettiğini ispatlar. Polimer malzemeler genel olarak çevresel koşullardan çabuk etkilenip mevcut özelliklerini kaybedebilirler. İletken polimerler de ise çevresel faktörlerin ve uygulanan farklı potansiyellerin etkisi ile redoks çiftlerinde kusurlar ve bozulmalar meydana gelebilir. Bunlar elektrokromik kontrastın ve elektrokromik özelliklerin kaybedilmesi ile sonuçlanır.

CV iletken polimerlerin uzun vadeli kararlılığını yorumlayabilmek ve saptayabilmek için oldukça önemli ve pratik bir tekniktir. CV çalışmaları atmosferik şartlar altında, oda sıcaklığında, 250 mV/s tarama hızında ve -0,6 V ile 1,5 V potansiyel aralığında 200 döngü yapılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 6.3'te gösterildiği gibi CH-P(M2)'nin ilk döngüsü ile 200. döngüsü arasındaki fark % 16'dır. Yani oluşturulan kompozit malzeme % 84 oranında bir redoks stabilitesine sahiptir.

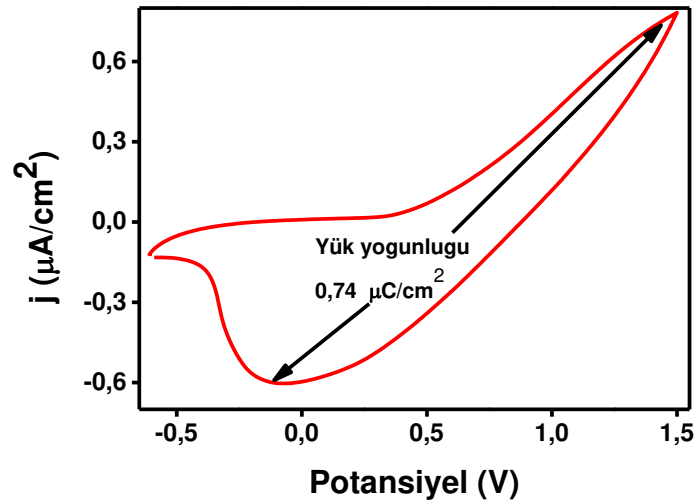


Şekil 6.3 CH-P(M2) için 250mV/s tarama hızında monomersiz 0,1 M TBP6/DCM ortamında 1. ve 200. dönüşümlü voltamogramlar

6.1.4 CH-P(M2) Kompozitinin Elektriksel Yük Kapasitesi

Yüzey alanı başına katkılanmış ya da katkılanmamış iyon aktarımı için gerekli elektrik yükünün bir miktarı yük yoğunluğu (CD) ile ifade edilir. CD'yi tespit etmek için önceden CH-P(M2) ile kaplanmış ITO ile monomersiz 0,1 M TBP6/DCM destek elektrolit-çözücü elektrokimyasal hücresinde dönüşümlü voltametri tekniği vasıtasıyla 250 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

CHP(M2)'nin yük yoğunluğu 250 mV/s tarama hızında CV grafiğinin yükseltgenme eğrisinin altında kalan alanın integrali alınarak belirlenmiştir. Şekil 6.4'de CH-P(M2)'nin yük yoğunluğu gösterilmiştir ve 0,74 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 6.4 CH-P(M2) için 500 mV/s tarama hızında 0,1 M TBP6/DCM ortamında yük yoğunluğunu göstermek için alınmış dönüşümlü voltamogram

Tablo 6.1’de ilgili literatüre dayanılarak P(M2) için ve deneyler sonucunda elde edilen verilere göre CH-P(M2) için $E_{onset,ox}$, stabilite ve yük yoğunluğu (CD) değerleri özetle ve karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Kompozit için başlangıç oksidasyon potansiyeli P(M2)’ya göre daha büyüktür. ITO yüzeyindeki kitosan iletken polimerin yapısına etki ederek M2’nin oksidasyonu ve polimerleşmesi için gerekli başlangıç potansiyelini yükseltmiştir. Ayrıca kompozitin P(M2)’ya göre yük yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir bu kitosanın iletken polimerin aktif redoks bölgelerini kapatmasından kaynaklanıyor olabileceği belirlenmiştir. Bunun yanında CH-P(M2) kompozit filminin iletkenliğinin P(M2)’nin iletkenliğinden daha düşük olduğu belirlenmiştir ve bu oksidasyon pik potansiyellerinin yüksek indirgenme pik potansiyellerinin düşük olmasının diğer bir sebebidir. P(M2)’nin CH-P(M2)’ya göre daha stabil olduğu görülmektedir.

Tablo 6.1 P(M2) ve CH-P(M2) için $E_{onset,ox}$, Stabilite ve CD değerleri

Malzeme	$E_{onset,ox}(V)$	Stabilite (%)	CD (mC/cm ²)
P(M2) ^a	0,58	98	3,26
CH-P(M2)	0,66	84	0,00074

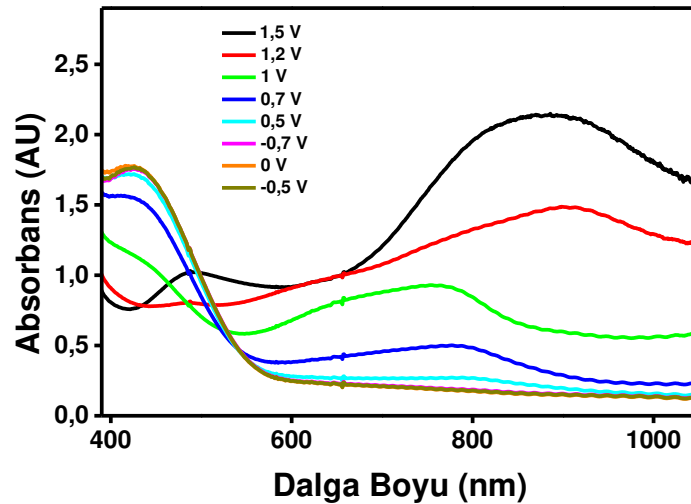
^a (Soğancı, 2017)

6.1.5 CH-P(M2)'nin Spektroelektrokimyasal ve Elektrokromik Özellikleri

Uygulanan voltaj değişimine bağlı olarak konjuge polimerlerin optik ve elektrokimyasal özelliklerini araştırmak için Spektroelektrokimya tekniği kullanılmaktadır. Spektroelektrokimya tekniği ile sentezlenen polimerin uygulanan potansiyeldeki optik özellikleri ve elektronik geçişleri gibi hususları araştırmak mümkündür. Bu çalışmalar daha önce ITO yüzeyinde sentezlenen polimerin belirli potansiyellerde monomer içermeyen destek elektrolit çözücü ortamında spektrumunun alınmasıyla gerçekleştirilmiştir.

CH ile modifiye edilmiş ITO elektrotu yüzeyi 30 sn boyunca 1,5 V 'da 0,02 M M2 monomeri içeren 0,1 M TBP6/DCM çalışma hücresinde P(M2) ile kaplanmıştır. Ardından monomer içermeyen elektrolit/çözücü ortamında 250 mV/s tarama hızında -0,5 V ile 1,5 V potansiyelleri arasında CH-P(a-M2)'nin UV spektrumları test edilmiştir. Uygulanan her potansiyel için dalga boyuna karşılık absorbans değişimi grafik ile gösterilmiştir (Şekil 6.5).

CH-P(M2) kompoziti için spektroelektrokimyasal çalışmalar ile nötral halde $\pi-\pi^*$ geçişlerinin meydana geldiği dalga boyu belirlenmiş ve bu dalga boyundaki yasak enerji aralığı veya band boşluk enerjisi hesaplanmıştır. Ayrıca spektroelektrokimya çalışmaları sonucu çizilen grafik (Şekil 6.5) ile en yüksek absorbans farkının olduğu dalga boyları belirlenmiş ve bunlara bağlı olarak kinetik çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 6.5 CH-P(M2)'ye ait spektroelektrokimya grafiği

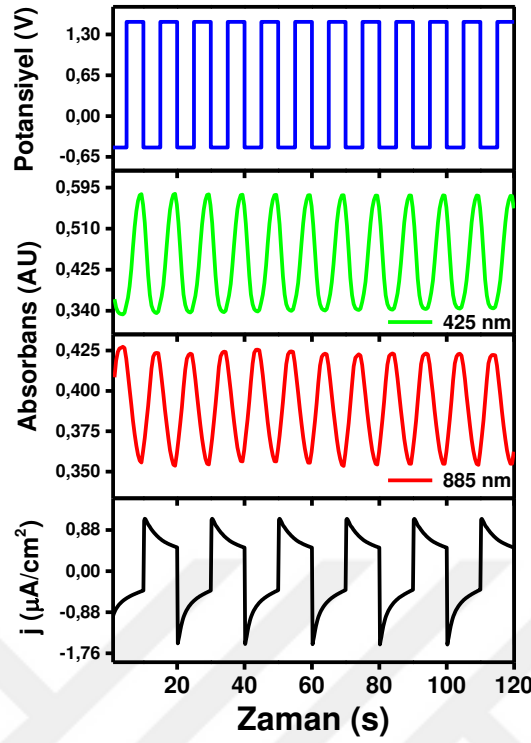
HOMO-LUMO enerji seviyeleri arasındaki optik bant boşluğu enerjisi olarak ifade edilen E_g , $\pi-\pi^*$ geçişlerinin olduğu dalga boyundaki başlangıç (onset) enerji absorpsiyonundan

faaydalanılarak hesaplanmıştır. $\pi\text{-}\pi^*$ geçişlerinin olduğu dalga boyu CH-P(M2) için 425 nm olarak belirlenmiş ve bunlara bağlı olarak optik bant boşluk enerjisi (E_g) CH-P(M2) için 2,92 eV olarak belirlenmiştir. Uygulanan voltajın artmasıyla 885 nm de yük taşıyıcıların büyümesinden dolayı yeni absorpsiyon bandı (polaron-bipolaron geçişi) oluşumu gerçekleşmiştir.

6.1.6 CH-P(M2) Kompoziti için Kinetik alışmaları

Elektrokimyasal uygulamalar için polimerin gözle görülür belirginlikte renk değişimi ve hızlı tepki verme yeteneğine sahip olması gerekir. Spektroelektrokimyasal testler sırasında elde edilen nötral durumda $\pi\text{-}\pi^*$ geçişlerinin meydana geldiği dalga boyunda, art arda tam renkli ve renksiz durum arasındaki geçişler ve tekrarlanan döngüler sırasındaki renksiz olma /renklenme prosesini anlayabilmek için kinetik çalışmalar yapılmış ve CH-P(M2)'nin elektrokromik tepki süresi bu çalışmalar vasıtasıyla en yüksek ve en düşük geçiş değerleri yardımıyla tespit edilmiştir. Kompozit malzemenin tepki süresi (switching time) ve optik kontrastı (ΔT %) en yüksek dalga boyunda (λ_{max}), monomersiz 0,1 M TBP6/DCM alışma hresi içerisinde ve UV-vis spektrofotometresi ile yapılan testlerle belirlenmiştir.

Kinetik alışmaları spektroelektrokimyasal çalışmalardan elde edilen verilere göre yapılmıştır. Buna bağlı olarak en yüksek absorbans farkının meydana geldiği dalga boyları ve potansiyel değerleri için P(M2)'nin redoks reaksiyon kinetiği çalışmaları yapılmıştır. Kinetik alışmaları için CH modifiyeli ITO elektrot yüzeyi 1,5 V'da M2 ile kaplanmış ve monomer biermeyen çözücü/destek elektrolit ortamında 425 nm ve 885 nm'de 5'er sn aralıklarla -0,5 V (nötral durum) ile 1,5V (yükseltgenmiş durum) arasında değişen bir potansiyel uygulanarak deneyler yapılmıştır (şekil 6.6). Buna göre CH-P(M2) için 425 nm'deki optik zıtlık % 16 ve tepki süresi 3,6 s olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 885 nm'deki optik zıtlık ve tepki süresi ise % 74 ve 2,8 s olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6.6 CH-P(M2) için 0,1 M TBP6/DCM destek elektrolit çözümü sisteminde, 355 ve 910 nm’de Absorbans-Zaman grafikleri

Polimerin onset potansiyelini ve bant boşluğu enerjisini yükseltmiştir. polimerin onset potansiyelini ve bant boşluğu enerjisini yükseltirken oluşan kompozit yapıda iletken polimerim konjuge çift bağlar arasında oluşan p-yığınlamasını engelleyerek iyonik geçirgenliğini kolaylaştırarak optik kontrast ve tepki zamanını iyi yönde geliştirmiştir.

Tablo 6.2’de P(M2) ve CH-P(M2) ile ilgili optik ve elektrokimyasal veriler verilmiştir. Bu veriler karşılaştırıldığında kompozitin başlangıç oksidasyon potansiyelinin P(M2)’ya göre yüksek olduğu görülür. Maksimum dalga boyları çok yakın olmasına karşın kompozitin bant boşluk enerjisinin daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Yani kompozitin elektriksel iletkenliği P(M2)’ya göre daha düşüktür. P(M2)’nın optik kontrastı kompozite göre daha iyidir ve tepki süresi daha kısadır. Sonuç olarak CH polimerin onset potansiyelini ve bant boşluğu enerjisini yükseltirken oluşan kompozit yapıda iletken polimerim konjuge çift bağlar arasında oluşan p-yığınlamasını engelleyerek iyonik geçirgenliğini kolaylaştırarak optik kontrast ve tepki zamanını iyi yönde geliştirmiştir.

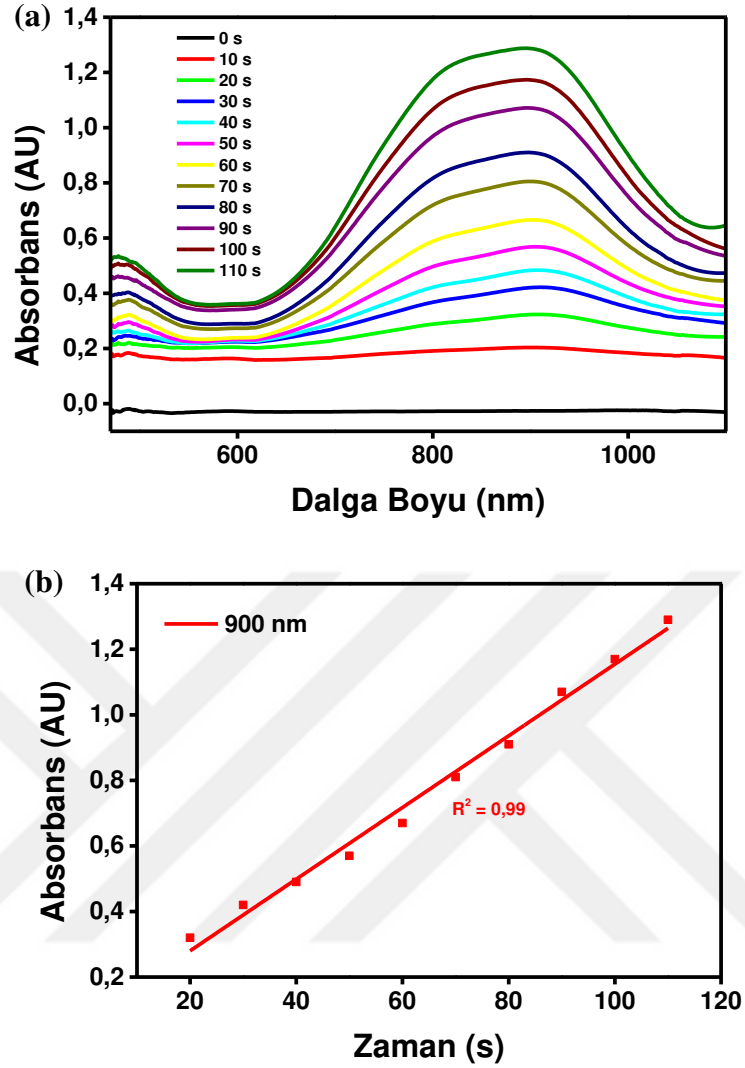
Tablo 6.2 P(M2) ve CH-P(M2) için optik ve elektrokimyasal veriler

Malzeme	$E_{\text{onset,ox}}$ (V)	λ_{max} (nm)	E_g^{op} (eV)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Optik Zıtlık (% ΔT)	Tepki Süresi (s)
P(M2) ^a	0,58	920	2,14	-4,28	-2,14	57	1,5
CH-P(M2)	0,66	885	2,92	-5,41	-2,48	74	2,8

^a (Soğancı, 2017)

Spektroelektrokimyasal ve kinetik çalışmaların yanında potansiyometrik ve spektroskopik metotlar birleştirilerek elde edilen CHP(M2) kompozitinin elektrokromik ve optik özellikleri zamana bağlı olarak araştırılmıştır. Bu amaçla 0,02 M M2 monomeri ve 0,1 M TBP6/DCM içeren çalışma hücresi UV-vis spektrofotometresine yerleştirilip spektrumları alınmıştır. Potansiyostat ve spektroskopi eş zamanlı çalıştırılmış ve potansiyometri cihazından 1,5 V sabit potansiyel uygulanarak testler yapılmıştır. 10'ar saniye aralıklarla polimerin yüzeye elektrokimyasal olarak kaplanmasına ilişkin absorbans değerleri tespit edilmiştir.

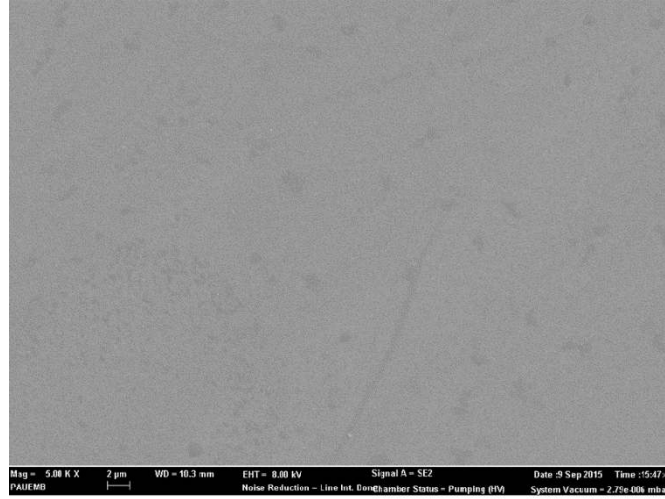
Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere bağlı olarak polimerizasyon boyunca dalga boyuna karşı absorbans değişimi grafik ile gösterilmiştir (Şekil 6.7 (a)). Bu grafik baz alınarak 110 saniye boyunca zamana karşı belirlenen dalga boyu olan 900 nm'deki absorbans değerleri grafiğe geçirilerek Şekil 6.7 (b)'de gösterilmiştir. Absorpsiyon süreci 20 s'den 110 s'ye değişen zaman aralığında absorbans değişimi lineerdir ve elektrokimyasal prosesin difüzyon kontrollü olmadığını ispatlamaktadır.



Şekil 6.7 (a) CH-P(M2) için UV-vis spektrumları, (b) CH-P(M2) için 900 nm’de zamana bağlı absorbans değişim grafiği

6.1.7 CH-P(M2) Kompozitinin Morfolojik Karakterizasyonu

CH-P(M2) kompozit filminin morfolojik karakterizasyonunu yapmak için ITO cam elektrot yüzeyi öncelikle CH ile modifiye edilmiş ve ardından sabit 1,5 V potansiyelde, 30 s boyunca, 0,1 M TBP6/DCM içeren ortamda M2 monomerinin elektrokimyasal olarak polimerleştirilmesiyle oluşan P(M2) ile kaplanmıştır. Oluşan yüzeyi analiz edebilmek için her aşamanın ayrı ayrı SEM fotoğrafı alınmıştır. Şekil 6.8 ‘te boş ITO kaplı cam elektrot yüzeyi gösterilmiştir.



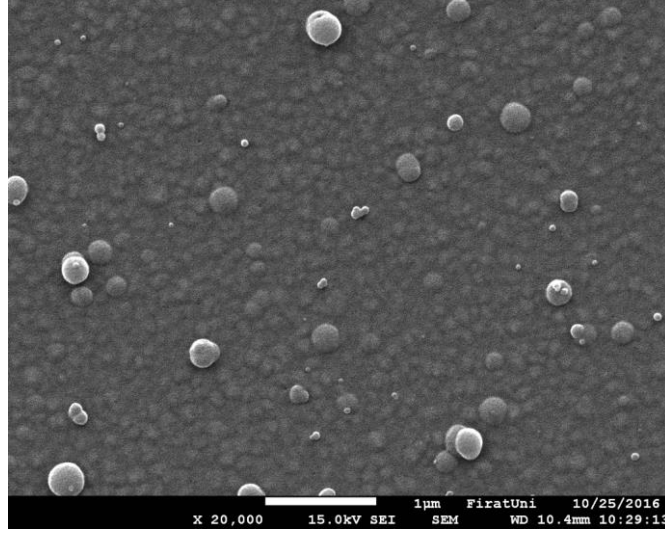
Şekil 6.8 Boş ITO kaplı cam elektrot (5000 x)

Elektrot yüzeyi CH ile kaplandıktan sonra alınan SEM fotoğrafı Şekil 6.9’da gösterilmiştir. Önceki bölümde de bahsedildiği gibi CH bir biyo-malzemedir ve ortam koşullarına karşı hassastır. Yüksek büyültmelerde yüzeye yoğun bir biçimde elektron gönderilmektedir ve bu CH’nin bozulmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle yüzeyin en fazla 5000 kez büyültme ile kaliteli görüntüsü alınabilmektedir.



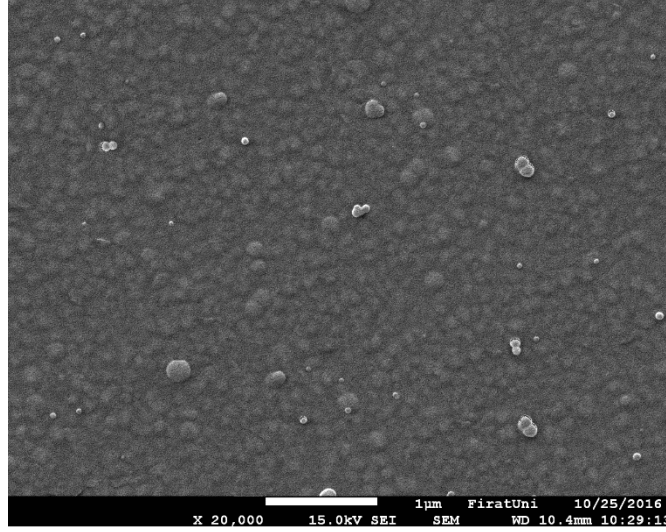
Şekil 6.9 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde CH için SEM görüntüsü (5000 x)

Oluşturulan kompozit biyo-iletken kompozit malzemenin yüzeyini yorumlayabilmek için öncelikle ITO cam elektrotu yüzeyi sadece 1,5 V sabit potansiyelde 30 s kaplanarak elde edilen P(M2) iletken polimer filmi varlığında SEM fotoğrafı alınmıştır. P(M2)’nin yüzeyi Şekil 6.10 ‘de gösterildiği gibi taneciklidir.



Şekil 6.10 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde P(M2) için SEM görüntüsü (20000 x)

Elektrot yüzeyi önce CH ve sonra P(M2) ile kaplanarak elde edilen CH-P(M2) kompoziti P(M2)'nin yüzey karakteristiğini taşımaktadır (Şekil 6.11). Ancak yüzeyde CH bulunduğunda tanecikler daha küçülmüştür. Bu CH ince filminin yüzeyde elektron iletimini zorlaştırması ve daha az polimerin yüzeye kaplanmasına sebep olmasından kaynaklanmaktadır. Yüzey görüntülerinin benzer olması CH katmanının P(M2) katmanının ITO elektrodu arasında bağlayıcı modifiye yüzey oluşturarak ve P(M2) için plastikleştirici etki yaparak stabilitesini artırırken yüzey özelliklerinde çok büyük bir farklılığa neden olmamaktadır. Ayrıca elektrot yüzeyi sadece CH ile kaplıyken malzemenin çok hassas olması sebebiyle yüksek büyültmelerde kaliteli SEM görüntüsü alınamamıştır. Ancak CH yüzeyi P(M2) ile kaplandıktan sonra daha yüksek büyültmeler ile kaliteli SEM fotoğrafı alınması kolaylaşmıştır.



Şekil 6.11 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde CH-P(M2) için SEM görüntüsü (20000 x)

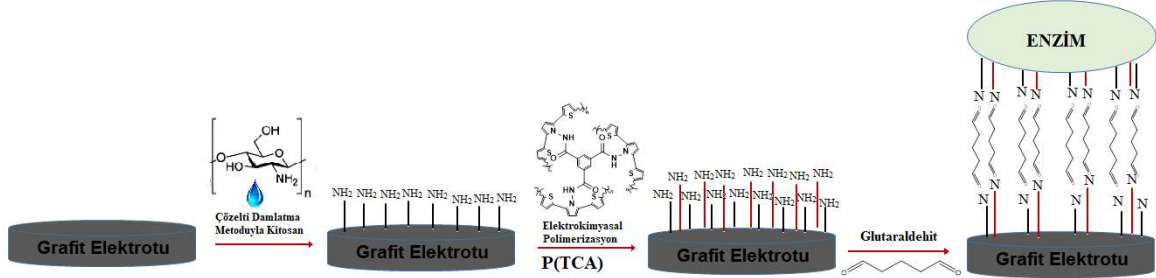
6.2 CH-P(M2) Kompozit Filminin Biyosensör Özellikleri

Biyomolekül temelli deteksiyon teknolojileri gıda/içecek endüstrileri, hastalıkların teşhisi, biyoproseslerin görüntülenmesi ve çevresel kirliliklerin taranması gibi çeşitli uygulamalar için dikkat çeken bir potansiyele sahip olduklarından birçok güncel araştırmanın odak noktası haline gelmiştir. Biyomolekül immobilizasyonu için dönüştürücü yüzeyinin modifikasyonu ve farklı gereksinimler için biyosensörün stabilitesini arttırmak biyosensör çalışmalarının temel noktasıdır. Glikoz klinik kimya, fermentasyon ve gıda endüstrisinde tespit edilmesi gereken önemli bir maddedir. Bu nedenle sürekli yeni glikoz tespit ve analiz sistemleri dizayn edilmekte ve mevcut sistemler sürekli geliştirilmektedirler.

CH ve P(M2)'nin özellikleri birleştirilerek GOx glikoz biyosensör immobilizasyon platformu oluşturulmuştur. Bu doğrultuda kullanılan ikinci elektroaktif monomer (Soğancı, 2017) N^1, N^3, N^5 -tris(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)benzen-1,3,5-trikarboksamid (M2)'dir. Kitosan ve iletken polimer kullanılarak biyomolekül (enzim) ve polimer immobilizasyon platformu arasındaki güçlü bağlar vasıtasıyla kararlı ve stabil bir biyolojik tanılama platformu oluşturmak amaçlanmıştır.

Şekil 6.12'da CH-P(M2) kompoziti ile grafit çalışma elektrotu yüzeyinde oluşturulan glikoz oksidaz enzim immobilizasyon platformunun üretim aşamaları gösterilmiştir. (M2) iletken

olmasının yanında NH_2 gruplarına sahiptir. Yani P(M2) elektrot yüzeyindeki elektron transferini kolaylaştırmanın yanında immobilizasyon işleminde de görev almaktadır.



Şekil 6.12 Biyosensör elektrotunun üretimi

M2 monomeri elektrokimyasal olarak CH ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyinde polimerleştirilmiştir. Bu işlem 0,02 M M2 ve 0,1 M TBP6/DCM içeren bir hücrede grafit elektrot yüzeyi 30 s boyunca sabit 1,5 V potansiyel ile elektrokimyasal olarak kaplanarak gerçekleştirilmiştir.

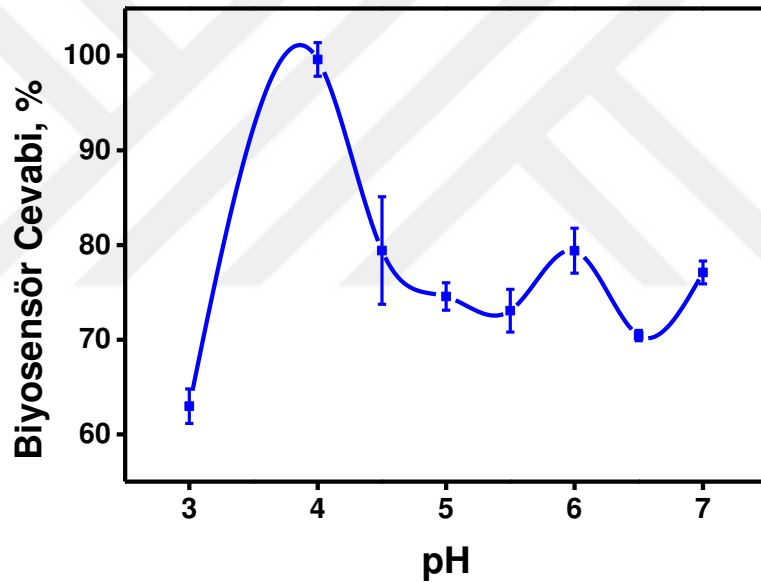
Biyosensörün çalışma prensibi ortamda glikoz bulunduğu durumda enzimin katalitik aktivitesine bağlı olarak tüketilen oksijen miktarının hesaplanmasına dayanır. Enzimin yüzeye kovalent olarak bağlanması için iki fonksiyonlu çapraz bağlayıcı glutaraldehit kullanılmıştır. Glutaraldehit enzim ve CH-P(M1)'nin amin grupları arasında kovalent bağlanmanın gerçekleşmesi için çapraz bağlayıcı görevi görür.

6.2.1 CH-P(M2)-GOx Glikoz Biyosensörü için pH Optimizasyonu

Doğru pH değerinde çalışmak biyosensörün enzim aktivitesini veya hazırlanan yüzeye biyosensörün cevabını izlemek için oldukça önemlidir. Biyosensör fabrikasyonunda pozitif veya negatif yüklü grupları içeren immobilizasyon matrisinin durumu kullanılacak tampon çözeltinin pH'ına etki eder. Bu nedenle biyosensör çalışmalarında kullanılacak tampon çözeltinin optimum pH değerinin hazırlanan biyosensöre özgün olarak tespit edilmesi oldukça önemlidir.

CH-p(M1) glikoz biyosensörünün çalışma koşullarını belirlemek amacıyla pH optimizasyonu yapılmıştır. Böylece hazırlanan biyosensör için en uygun pH değeri tespit edilmiştir yapılan diğer testlerde bu değerde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla pH değeri 3 ve

7 arasında değişen 8 tampon çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu tampon çözelti ortamlarında biyosensörün cevabı aranmıştır. 10 ml tampon çözelti içeren 3 elektrotlu amperometrik test hücresi hazırlanmış ve $Ag^+/AgCl$ referans elektrotuna karşı CH-P(M2) kompoziti ile hazırlanmış enzim çalışma elektrotundan gelen akım stabil olana kadar beklenmiştir. Kararlı bir akım elde edildiğinde ortama 25 μl 0,1 M'lık glikoz çözeltisinden eklenmiş ve elde edilen akım farkı kaydedilmiştir. Çeşitli pH değerleri için biyosensörün nispi cevabı şekil 6.13'de gosterilmiştir. Maksimum cevap pH 4 değerinde elde edilmiştir. Biyosensör fabrikasyonunda kullanılan negatif veya pozitif yükl gruplar içeren immobilizasyon matrisi (CH ve P(M2)) alışma hücresinde kullanılacak olan tampon çözeltinin optimum çalışma pH değeri önemli ölçüde sensör cevaplarına etki edebilmektedir. Optimum pH değeri biyosensör fabrikasyonunda kritik bir yere sahiptir.

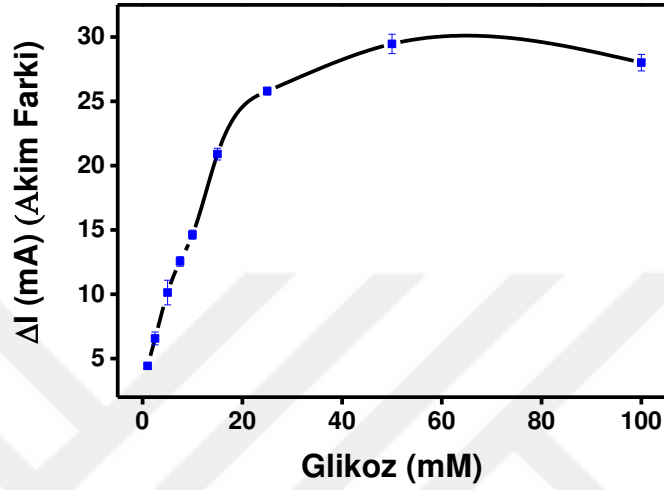


şekil 6.13 CH-P(M2) biyosensörü üzerinde pH etkisi (0,1 M sodyum fosfat tamponu içerisinde, -0,7V)

6.2.2 CH-P(M2)-GOx Glikoz Biyosensörü için Kalibrasyon alışmaları

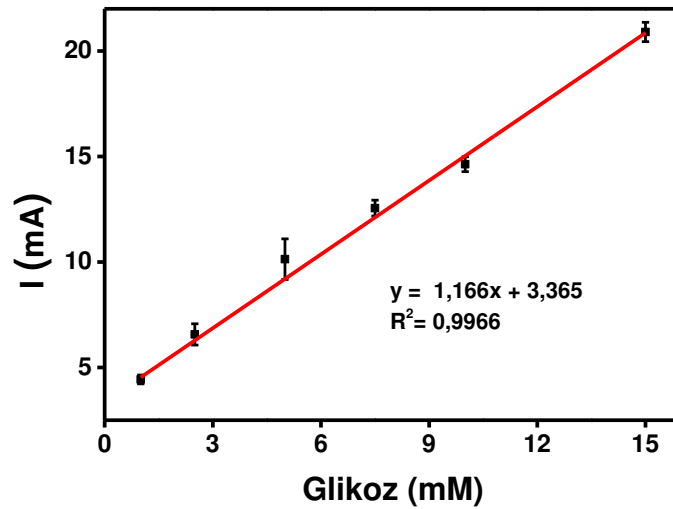
Biyosensör cevabının glikoz konsantrasyonuna bağlılığını araştırmak amacıyla pH 4'te 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde sabit -0,7 V potansiyelde farklı konsantrasyonlardaki glikoz çözeltileri ile testler gerçekleştirilmiştir. Glikoz konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen akım değerleri kalibrasyon grafiğinde (şekil 6.14) gosterilmiştir. 1 mM'dan 100 mM'a kadar olan glikoz konsantrasyonları için sensörün verdiği cevap (akım farkı (mA)) değerleri tespit edilmiştir. 25 mM' kadar olan glikoz

konsantrasyonlarında akım farkı sürekli artarken 25 mM'dan sonra akım farkı artışı azalmıştır.



Şekil 6.14 CH-P(M2) enzim elektrotu için kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,0, - 0,7V).

CH-P(M2) biyosensörü 1 mM ve 15 mM glikoz konsantrasyonları için lineer olarak cevap vermiştir (Şekil 6.15). 15 mM'dan sonra biyosensörün cevabı lineer olarak değişmemektedir. Lineer bölge için denklem $y = 1,166x + 3,365$ şeklindedir burada y akım farkını (sensörün cevabı – (mA)) ve x ise glikoz konsantrasyonunu mM cinsinden göstermektedir.

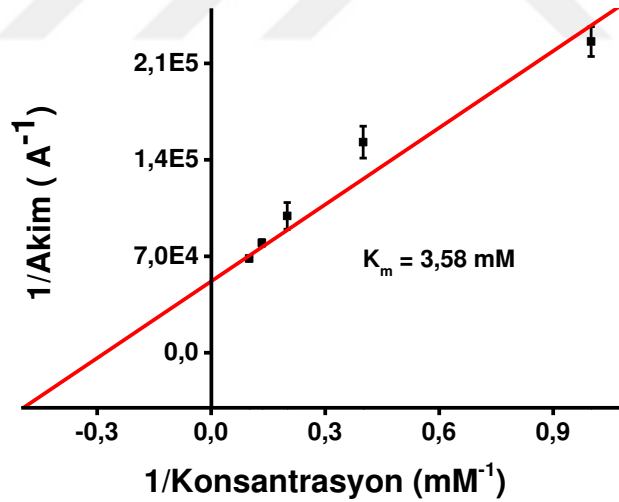


Şekil 6.15 CH-P(M2) biyosensörü için lineer kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,0, - 0,7V).

Ticari amaçlı kandaki şeker tespiti amacıyla kullanılan sensörlerin lineerlik sınırı vücuttaki fizyolojik glikoz konsantrasyonu olan 15 mM' dır (Harper, 2005) . CH-P(M2) enzim biyosensörünün lineerlik sınırı 15 mM'dır ve bu üretilen sensörün gıdadaki glikoz deteksiyonu için uygun olmasının yanında pratik canlı içi (in vivo) kullanım için'de uygun olduğunu gösterir. Ayrıca artan glikoz miktarına karşı CH-P(M2)'nın verdiği lineer sürekli hal cevabı etkili bir glikoz oksidasyonu meydana geldiğini göstermektedir.

Gözlenebilme sınırı (LOD) farklı biyosensörleri karşılaştırmak için iyi bir metottur. Önceki bölümde anlatıldığı gibi CH-P(M2) lineer kalibrasyon grafiğinden (Şekil 6.15) faydalanılarak LOD değeri 0,57 mM olarak belirlenmiştir.

Glikozun oksidasyonu sonucu meydana gelen reaksiyon GOx enziminin katalizörlüğü eşliğinde gerçekleşmektedir. Reaksiyonun kinetiği hakkında yorum yapabilmek için Michaelis-Menten sabiti K_m değeri Lineweaver–Burke grafiği (Şekil 6.16) yardımı ile 3,58 mM olarak tespit edilmiştir. K_m değerinin küçük olması GOx enzimi tarafından glikozun daha iyi okside olduğunu gösterir.

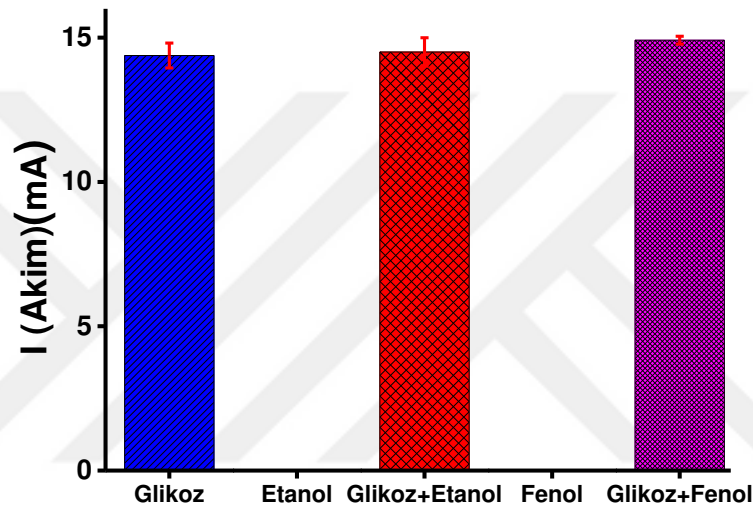


Şekil 6.16 CH-P(M2) enzim elektrotu için Lineweaver–Burke grafiği

6.2.3 CH-P(M2)-GOx Glikoz Biyosensörüne Girişimci Madde Etkisi

Biyosensörün seçiciliği ortama eklenecek girişimci maddelere karşı sensörün cevabı araştırılarak yapılmıştır. Biyosensör çalışma hücreesine glikoz olmadan ve glikoz ile birlikte etanol ve fenol enjekte edilmiş ve sensörün verdiği cevap incelenmiştir. Şekil 6.17'de

Çalışma hucresine aynı anda 0,1 M'lık girişimci çözeltisinden 7,5 mM ve girişimci ve glikoz çözeltisinden aynı anda eşit miktarda (7,5 mM) enjekte edildiğinde CH-P(M2) glikoz enzim sensörünün verdiği cevap gösterilmiştir. Grafikte de gösterildiği gibi ortamda etanol ya da fenol bulunduğunda sensörde herhangi bir cevap gözlenmemiştir. Bunun yanında girişimci ve glikoz birlikte ortama enjekte edildiğinde sadece glikoz için verilen sensör cevabı ile aynı olan bir cevap elde edilmiştir. Yani etanolün ve fenolün CH-P(M2) glikoz biyosensörü üzerinde girişimci etkisi yoktur ve hazırlanan biyosensörün glikoz için seçiciliği test edilen girişimciler karşısında oldukça iyidir.



şekil 6.17 CH-P(M2)-GOx glikoz biyosensörüne ortamdaki girişimci etkisi (pH 4, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda)

6.2.4 CH-P(M2)-GOx Glikoz Biyosensörü ile Gerçek rneklerde Glikoz Tayini

CH-P(M2)-GOx glikoz biyosensörü ile üç farklı ticari içeceklerdeki glikoz miktarı başarılı olarak tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır (Tablo 6.3). Testler pH 4'te sodyum fosfat tamponu içerisinde yapılmıştır ve çalışma hucresine eklenen glikoz miktarı (7,5 mM) lineerlik sınırı içinde bulunur. Böylece CH-P(M2)-GOx biyosensörü için çizilen lineer kalibrasyon grağiği vasıtasıyla gerçek örneklerdeki glikoz miktarına ulaşılır. Kola, meyve suyu ve gazoz için biyosensörün cevabı sırasıyla 6,792, 5,812 ve 2,442 iken spektroskopik yöntemle elde edilen sonuçlar sırasıyla 6,174, 5,917 ve 2,656'dır. Aradaki benzerlik kola, meyve suyu ve gazoz için sırasıyla % 91, 102 ve 109'dur. Bu sonuçlara bakılarak hazırlanan biyosensörün ticari pratik uygulamalar için uygun olduğunu göstermektedir.

Tablo 6.3 CH-p(M2) biyosensörünü kullanarak ve spektrofotometrik yöntemi kullanarak içecekler içerisindeki toplam glikoz miktarının saptanması sonuçları

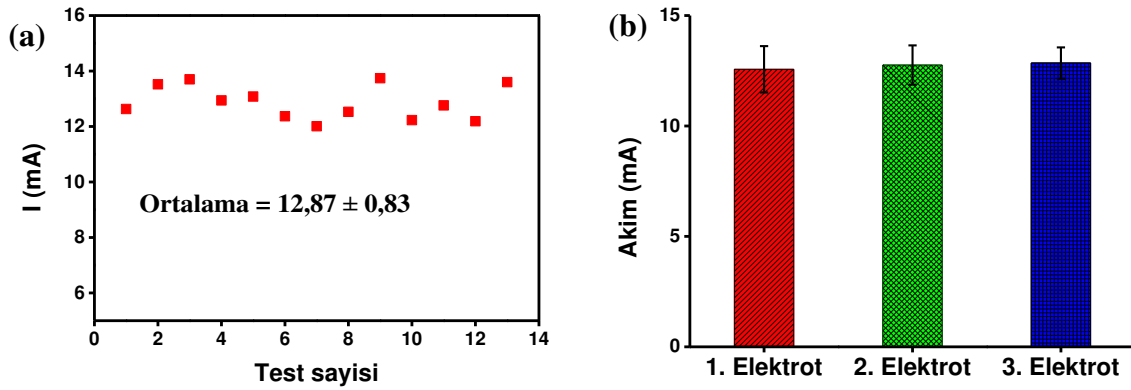
Numune	Glikoz(mM)*		
	CH-p(M1)	Spektrofotometrik	Benzerlik %
Kola	6,792 ± 0,07	6,174 ± 0,008	91
Meyve suyu	5,812 ± 0,1117	5,917 ± 0,002	102
Gazoz	2,442 ± 0,154	2,656 ± 0,001	109

*Sonuçlar en az üç testin ortalamasıdır ± standart sapmadır.

6.2.5 CH-P(M2)-GOx Sensör Platformunun Stabilitesi

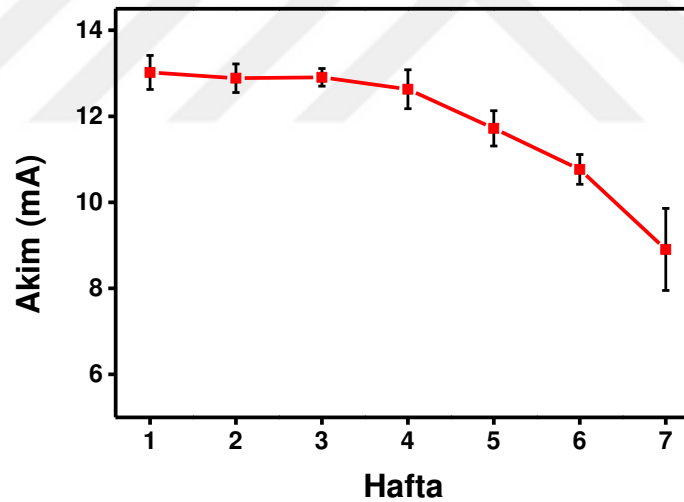
Hazırlanan CH-P(M2)-GOx biyoelektrotu ile elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olup olmadığını araştırmak için öncelikle aynı elektrot ile 0,1 M sodyum fosfat tamponu içeren ve pH'ı 4 olan hücrede ortama 7,5 mM glikoz eklenerek art arda 13 test yapılmıştır (Şekil 6.18 (a)). Biyosensörün bu testler sonucunda verdiği cevabın ortalaması $12,87 \pm 0,83$ mA olmuştur. Art arda yapılan bu testlerde sensörün cevabında çok büyük sapmalar gözlenmemiştir.

Tek bir elektrot ile 50 teste kadar deneme yapılabilmiştir. Hazırlanan biyosensör elektrotunun tekrarlanabilirliğini araştırmak için ayrı ayrı aynı şartlar altında hazırlanan üç elektrot kullanılarak testler yapılmıştır. Çalışma hücrelerine 5 mM glikoz eklenerek her bir biyoelektrotun verdiği cevap izlenmiş ve yaklaşık olarak her üç elektrottan aynı cevapları verdiği gözlenmiştir (Şekil 6.18 (b)). Bu sonuca göre aynı şartlarda hazırlanan CH-P(M2)-GOx enzim platformlarının eklenen glikoza karşı aynı cevapları verdiği yani tekrar kalibrasyona gerek duymayan oldukça kararlı ve sürekli enzim platformlarının hazırlanabileceğini göstermiştir. Literatürde genellikle hazırlanan her elektrot için farklı kalibrasyon hazırlanması gerektiğinden CH-P(M2)-GOx enzim platformlarının ticari uygulamalar için oldukça stabil sonuçlar verdiği görülmektedir. Sonuç olarak kitosan içeren P(M2) enzim platformundan oldukça stabil ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir. Bu enzim platformunun farklı enzim ve substratlar için stabil ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebileceğini göstermektedir



Şekil 6.18 CH-P(M2)-GOx için (a) Biyoelektrotun art arda yapılan testlere verdiği cevap, (b) Tekrarlanabilirlik (Çalışma hücreesine 7,5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 4’de)

Çalışmalarda kullanılan elektrotlardan biri çalışma tampon çözeltisi içerisinde (pH 4, sodyum fosfat tamponu) ve 4 °C ‘de saklanmış ve 7 hafta boyunca test edilmiştir (Şekil 6.19). Biyosensörün cevabı ilk üç hafta stabil iken 3. haftadan sonra sapmalar ve düşmeler değerlerde sapmalar ve düşmeler başlamıştır.



Şekil 6.19 CH-P(M2)-GOx için Stabilite çalışması (7,5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 4’de)

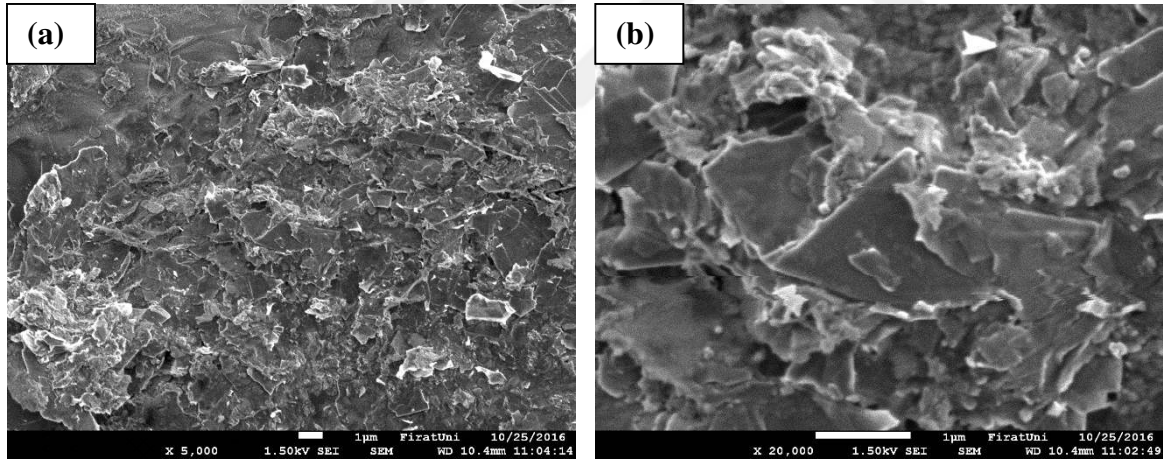
Tablo 6.4’de P(M2) ve CH-P(M2) ile oluşturulan GOx immobilizasyon platformlarının glikoza verdikleri cevaplar gösterilmiştir. Bu da hazırlanan kompozit bileşenlerinin biyosensör uygulamaları için sinerjik bir etki yaptığını göstermektedir. Kompozit yapı içerisindeki kitosan üzerindeki amin grupları ile enzimin stabil bir şekilde immobilize edilmesini sağlarken iletken polimer için de plastikleştirici etki ile iyon geçişini dolayısıyla elektriksel özelliklerini arttırarak biyokimyasal reaksiyon sonucundaki akım farklılığının artmasına sebep olmaktadır.

Tablo 6.4 CH, P(M2) ve CH-P(M2) enzim immobilizasyon platformları (n = test sayısı, 0,1M sodyum fosfat tamponunda, pH 4'te, çalışma hücresine 25mM glikoz enjekte edilerek)

İmmobilizasyon Platformu	Biyosensör Cevabı	Standart Sapma
P(M2)-GOx-GAL	14,9	$\pm 0,14(n=4)$
CH-P(M2)-GOx-GAL	25,8	$\pm 0,3 (n=10)$

6.2.6 Grafit CH-P(M2)-GOx Biyoelektrotunun Morfolojik Karakterizasyonu

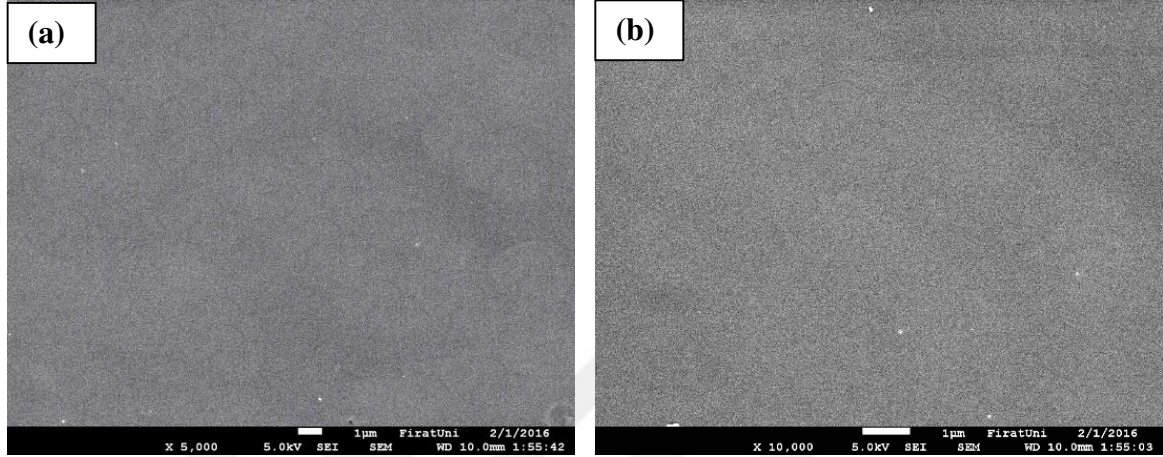
Hazırlanan biyoelektrotun morfolojik yapısı her bir aşama için adım adım SEM ile karakterize edilmiştir. Biyosensör çalışmalarında grafit elektrot kullanıldığı için ilk olarak grafit elektrotun parlatılmış ve temizlenmiş haldeki yapısı incelenmiştir. Boş grafit elektrotun yüzeyi taramalı elektron mikroskobu ile Şekil 6.20 (a)'da 5000 ve (b)'de 20000 kez büyütülerek gösterilmiştir. Görüntülerden de anlaşılacağı gibi grafit yüzeyi düz olmayan ve tabakalı bir yapıya sahiptir.



Şekil 6.20 Boş grafit elektrot için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

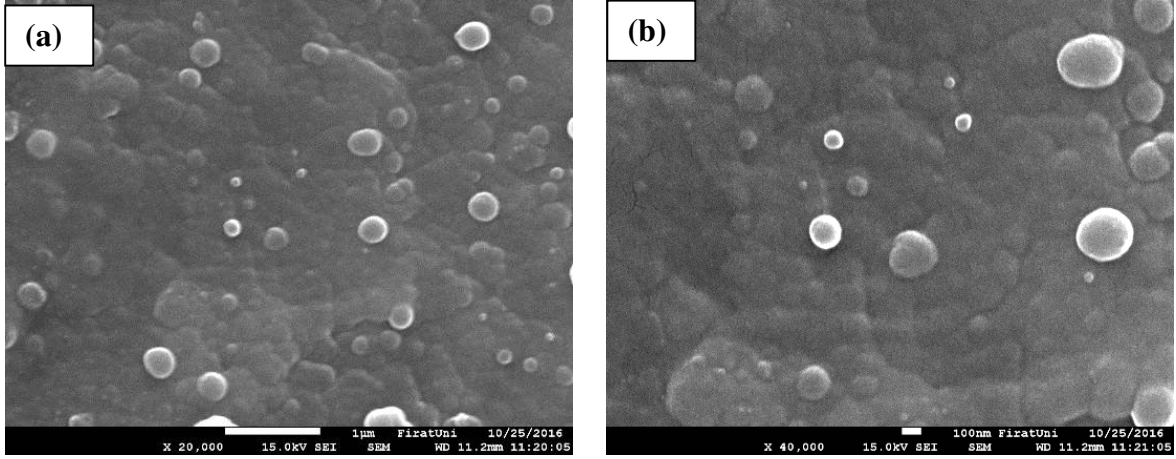
Grafit üzerinde biyosensör katmanları oluşturmaya kitosan ile başlanmıştır. Önceki bölümde anlatılmış olan prosedüre göre grafitin yüzeyi CH ile kaplanmış ve bu yüzeyi karakterize etmek için SEM fotoğrafları alınmıştır. Şekil 6.21 (a)'da 5000 ve (b)'de 10000 kez büyütülmüş CH kaplı elektrot yüzeyi görülmektedir. CH elektrot yüzeyini bir örtü gibi kaplamış pürüzsüz ve düz bir görünüm kazandırmıştır. Her iki fotoğrafta da benzer bir yapı görülmektedir. Oluşan yapı grafit yüzeyinden tamamen farklı olan bir yapıdır. CH bir biyopolimer malzemedir ve görüntü almak için yoğun bir biçimde gönderilen elektronlar yapısına zarar vermektedir. Bu nedenle büyütme oranı arttıkça SEM ile görüntü alımı

zorlaşmakta ve yüzeydeki CH gözle görünür bir biçimde bozunup yanmaktadır. Bundan dolayı en fazla grafit elektrotu üzerinde CH'nin 10000 büyütme kadar olan görüntüleri alınabilmektedir. Şekilde de görüleceği gibi 20000 ve üzeri büyültmelerde yüzeyde çatlaklar ve bozulmalar meydana gelmiştir.



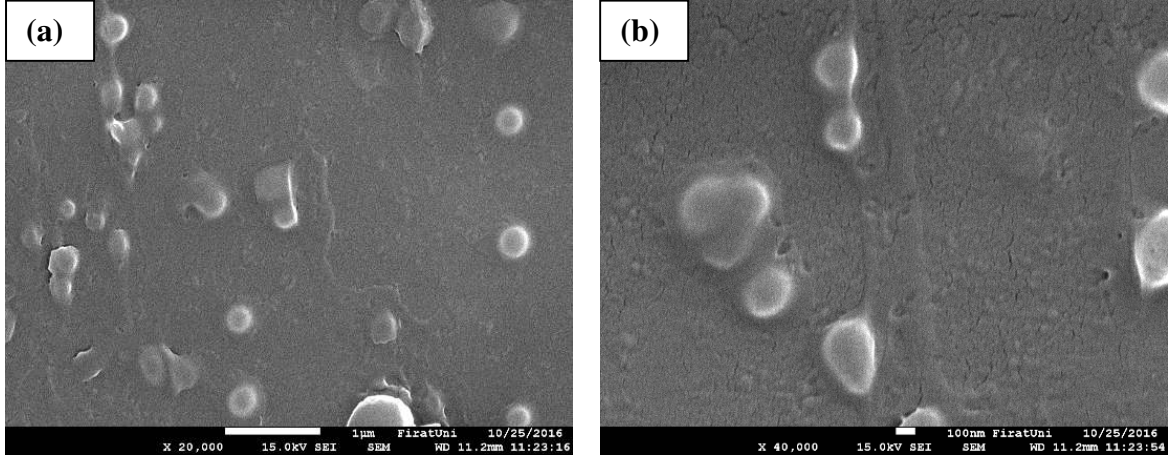
Şekil 6.21 CH ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 10000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

Biyoelektrot hazırlanmadan önce sadece P(M2)'nin grafit elektrotu yüzeyindeki morfolojisini karakterize etmek için ayrıca SEM görüntüleri alınmıştır. Böylece adım adım yüzeyde meydana gelen yapısal değişiklikler daha açık bir biçimde gözlenmiştir. Şekil 6.22'de P(M2) ile elektrokimyasal olarak kaplanmış grafit elektrotunun farklı büyütme oranları için SEM fotoğrafları gösterilmiştir. 10000 kez büyütülmüş resimde (Şekil 5.25 (a)) yüzeyde birikmiş olan P(M2) tanecikleri görülmektedir ve yüzeyde düz ancak tanelerden oluşan bir yapı meydana gelmiştir. Ayrıca P(M2) tanecikleri kendi arasındaki π - π etkileşimlerinden dolayı kümelenmiş yoğun polimer birikintileri oluşturmuşlardır. Şekil 5.25 (b) ise sırasıyla 40000 kez büyütülerek alınmış SEM fotoğrafları gösterilmiştir ve bu fotoğraflarda daha küçük alanlarda oluşan iletken polimer birikintileri ve kümelenmeler açıkça görülmektedir.



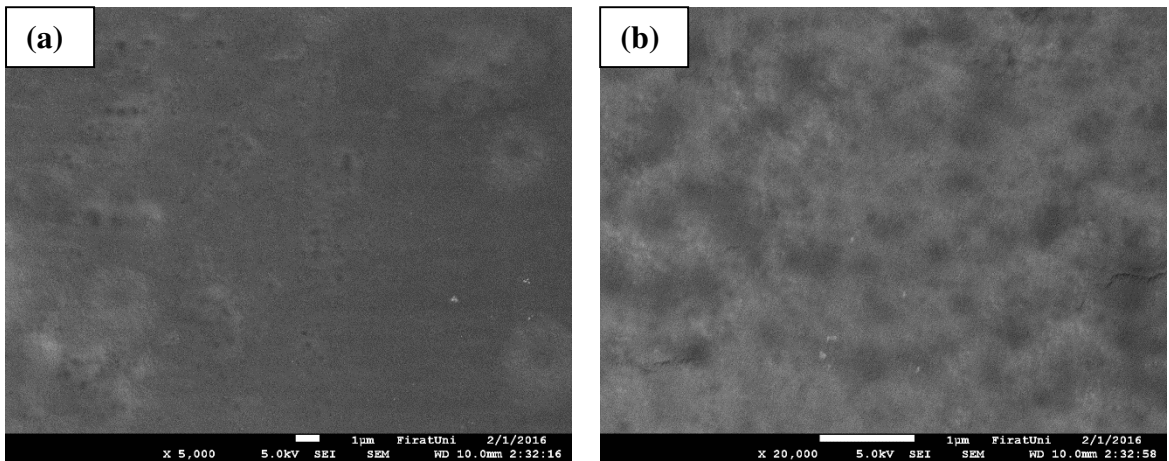
Şekil 6.22 P(M2) ile kaplanmış Grafit elektrotu için SEM görüntüleri (a) 20000, (b) 40000 kez büyütülmüş

Grafit elektrot yüzeyi önce damlatma metoduyla CH ile kaplanmış ve ardından elektrokimyasal olarak P(M2) ile kaplanmıştır. Grafit elektrot yüzeyinde elde edilen bu biyo-iletken-kompozit malzemenin Şekil 6.23 (a) ve (b)'de sırasıyla 20000 ve 40000 kez büyütme için alınmış SEM görüntüleri verilmiştir. Elektrotun tabanında sadece CH ile kaplanmış elektrota benzer olarak pürüzsüz ve düz bir yapı vardır. P(M2)'ya ait kümelenmiş tanecikli yapı azalmıştır. Ancak oluşan yapı P(M2)'nın karakteristik yüzey yapısına da benzemektedir. Elektrokimyasal ve biyosensör çalışmalarının sonuçları yüzey karakterizasyonu ile de desteklenmiştir. Yani kompozit için yüzeyde CH ve P(M2)'nin morfolojik özelliklerini taşıyan yeni bir yapı oluşmuştur. Yüzeyde iletken polimerin çok fazla birikmesi kitosanın aktif merkezlerini kapatıp enzim immobilizasyonunun etkin bir biçimde gerçekleştirilmesine engel olacağı için ve uzun süre direkt bir potansiyele maruz kalacak olan CH'nin yapısı bozulabileceği için yüzey sadece 30 sn P(M2) ile elektrokimyasal olarak kaplanmıştır. Tüm bunlara bağlı olarak oluşan yapının oluşturulmak istenen yapı olduğu söylenebilir. Ayrıca sadece CH ile kaplı olan yüzeyde SEM görüntüsü almakta sıkıntı yaşanırken P(M2) ile yüzeyin kaplanması sonrasında bu zorluk ortadan kalkmıştır. Bu oluşan P(M2)'nin yapıyı daha stabil hale getirdiği şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 6.23 Grafit elektrotu üzerinde CH-P(M2) kompozitinin (a) 20000, (b) 40000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

CH ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyine glutaraldehit (GAL) aracılığıyla GOx enzimi immobilize edildikten sonra SEM görüntüleri alınarak biyoelektrotun morfolojik özellikleri karakterize edilmiştir (Şekil 6.24 (a) ve (b)). CH ve GOx biyolojik malzemelerdir ve SEM ile görüntülemeye yüksek oranlardaki büyültmelerde yüzey elektron bombardımanı sonucu yanmaktadır. Bu nedenle en fazla 20000 kez büyültme yapılarak elektrot yüzeyi görüntülenebilmiştir. Enzim yüzeye uniform bir biçimde dağıtıldıktan sonra GAL çapraz bağlayıcısı yardımıyla CH kompoziti ile amid bağları oluşturur ve bundan dolayı Şekil 6.24 (b)'de görüldüğü gibi sarmal görünümlü bir düzen oluşmuştur. Bu görüntü ile elektrot yüzeyindeki CH ve enzim arasında çapraz bağlanmanın gerçekleştiğinin ve enzimin immobilize edildiğinin ispatıdır.



Şekil 6.24 CH-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

7 KİTOSAN (CH) - 5-AMİNO-N¹,N³-BİS (2,5-Dİ(TİYOFEN-2-YL)-1H-PİROL-1-YL) İSOFTALAMİD (M3) KOMPOZİT FİLMİN HAZIRLANMASI SPEKTROELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİ VE GLİKOZ BİYOSENSÖRÜ

Kitosan biyoyumlu, biyolojik olarak bozunabilir, toksik olmayan, geniş bir pH aralığında stabil olan ve mükemmel adsorpsiyon özelliklerine sahip bir biyopolimerdir. Birçok reaktif gruba (- OH ve - NH₂) sahiptir ve bu nedenle enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan malzemelerden biridir.

İletken polimerler sahip oldukları polimer zinciri boyunca uzanan konjuge tek ve çift bağlar aracılığıyla elektriksel iletkenliği sağlarlar ve geleneksel polimer malzemelerin sahip olmadığı birçok üstün özelliğe sahiptirler.

Bu çalışma çerçevesinde kullanılan üçüncü elektroaktif monomer 5-amino-N¹,N³-bis (2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl) isoftalamid (M3)'dür (Soğancı, 2017) . Bu elektroaktif monomerin ITO cam elektrot ve grafit elektrot üzerinde CH ile kompozitleri hazırlanmış ve hazırlanan bu kompozitlerin elektrokimyasal, elektrokromik ve biyosensör olabilmek özellikleri araştırılmıştır.

7.1 (M3) Monomerinin CH ile Modifiye Edilmiş ITO Elektrotu Üzerindeki Elektropolimerizasyonu, Elektrokimyasal ve Elektrokromik Özellikleri

ITO kaplı cam elektrot kullanarak iletken polimerlerin elektrokimyasal ve optik özellikleri etkin bir biçimde araştırılabilmektedir. CH-P(M3) kompoziti ITO elektrotunun yüzeyinde hazırlanmış ve hazırlanan bu kompozitin elektrokimyasal, spektroeletrokimyasal ve elektrokromik özellikleri araştırılmıştır.

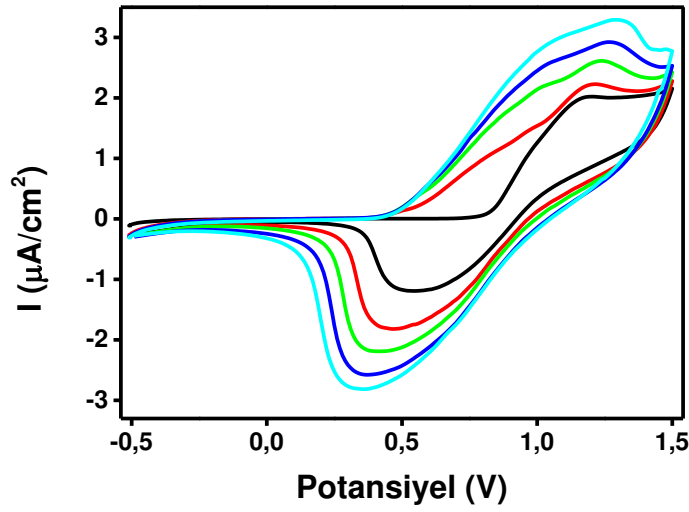
7.1.1 CH ile Modifiye Edilmiş ITO Yüzeyinde (M3) Monomerinin Elektropolimerizasyonu

ITO kaplı cam elektrot yüzeyi daha önce açıklanan prosedüre göre damlatma metoduyla CH ile modifiye edilmiştir. elektroaktif M3 monomeri elektrokimyasal olarak CH ile kaplanmış

ITO elektrot yüzeyinde polimerleştirilmiştir ve böylece hedeflenen ve iletken biyouyumlu bir kompozit malzeme olan CH-P(M3) kompoziti elde edilmiştir.

Elektrokimyasal ve elektrokromik çalışmalar 0,1 M LiClO₄/ACN ve 0,02 mM M3 içeren bir çalışma hücresinde yapılmıştır. Bu elektrot yüzeyindeki M3'nin elektropolimerizasyonu ve oluşan kompozitin elektroaktivitesi dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile araştırılmıştır. Şekil 7.1'de CH-P(M3)'ya ait CV çalışması grafiği verilmiştir. CV grafiğinde ilk döngü monomerin elektropolimerizasyonuna aittir ve buradaki pik monomerin oksidasyonunu göstermektedir. Diğer döngülerde ise biri oluşan iletken polimere diğeri monomere ait olan iki yükseltgenme piki bulunmaktadır. Akım artışını izleyen ardışık döngüler monomerin ITO yüzeyine iyi bir biçimde yapıştığını gösterir. -0,5 V ile 1,5 V potansiyel aralığında yapılan testlerde tersinmez monomer oksidasyon piki CH modifiyeli ITO yüzeyinde 2,04 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ olarak ölçülmüştür. Oksidasyon pikinin büyüklüğü elektron yoğunluğu ile ilişkilidir.

M3 için monomerin başlangıç oksidasyon potansiyeli (onset potential) 0,62 V (Soğancı, 2017) iken CH-P(M2)'nin 0,81 V'dir. Bu durum ITO yüzeyindeki ince CH filmin iletken olmayan yapısından kaynaklanmaktadır ve CH filmi iletken polimerin yapısına etki ederek elektroaktif monomerin polimerleşmesini zorlaştırmış ve başlangıç oksidasyon potansiyelinin yükselmesine sebep olmuştur. Ayrıca bu durum elektron yoğunluğunun azaldığına işaret etmektedir. Ancak buna rağmen monomerin polimerizasyonu gerçekleşmiş ve elektrot yüzeyinde elektrokimyasal yolla iletken polimer biriktirilerek istenen kompozit malzeme elde edilmiştir.



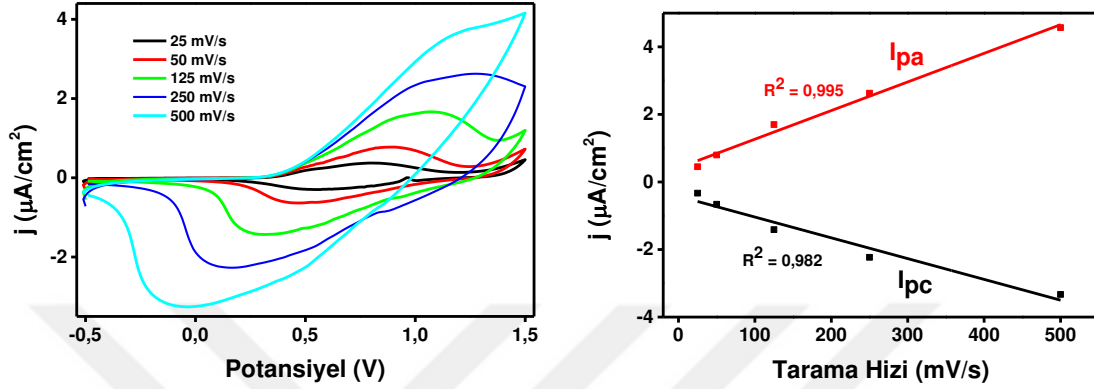
Şekil 7.1 CH modifiyeli ITO cam elektrot üzerinde 0,02 M M3 için 250mV/s tarama hızında 0,1 M LiClO₄/ACN destek elektrolit çözücü sistemi için dönüşümlü voltamogramlar

7.1.2 CH-P(M3)'nın Elektrokimyasal Özellikleri

CH-P(M3)'nın farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri tekniği ile elektrokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Bunun için öncelikle M3 monomeri 1,5 V sabit potansiyelde 0,1 M LiClO₄/ACN çözeltisinde CH ile kaplanmış ITO yüzeyinde elektrokimyasal yolla polimerleştirilmiştir. Ardından monomer içermeyen LiClO₄/ACN elektrolit çözücü çifti ortamında çeşitli tarama hızlarında dönüşümlü voltametri testleri yapılmıştır.

Şekil 7.2 (a)'da CH-P(M3) kompozitinin farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve Şekil 7.2 (b)'de ise Şekil 7.2 (a)'dan elde edilen veriler ışığında tarama hızının anodik ve katodik pik potansiyellerinde akım yoğunluğuna göre değişimleri gösterilmiştir. Randless-Sevcik eşitliğine dayanılarak dönüşümlü voltametride bir polimerleşme prosesinin difüzyona bağlılığı tespit edilmiştir. Elektrokimyasal deneylerde tarama hızı akım yoğunluğu ile orantılı ise bu proses difüzyondan bağımsızdır. $I_{pa}/I_{pc} \approx 1$ olması akım yoğunluğu ve tarama hızı arasında doğrusal bir orantı olduğuna ve prosesin difüzyon ile kontrol edilmediğine işaret eder. Buna göre CH-P(M3) için akım yoğunluğu ve tarama hızı arasında doğru orantılı bir ilişki söz konusudur, polimerizasyon işlemi difüzyon kontrollü değildir ve oluşan polimer yüzeye stabil bir biçimde tutunmuştur. Ayrıca $I_{pa} \approx I_{pc}$ olması elektrokimyasal davranışların yarı tersinir olduğunu ve üretilen polimerin kimyasal olarak tersinir olduğunu ispatlar.

CH-P(M3) kompozitinin oksidasyon için gerekli potansiyel yüksek ve indirgenme için gerekli potansiyeli oldukça düşüktür. Yani CH-P(M3) kompozit filminin iletkenliği ve redoks aktivitesi oldukça düşük olduğundan her döngüde oksidasyon için daha fazla potansiyel ve redüksiyon için daha düşük potansiyel gereksinimi ortaya çıkmıştır.

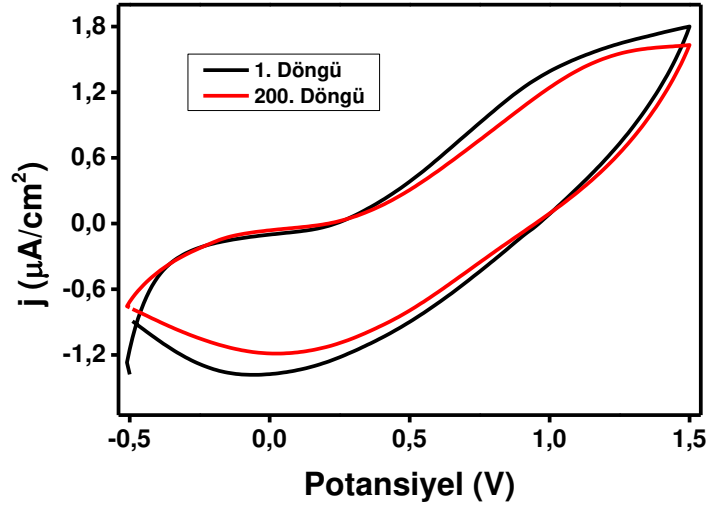


Şekil 7.2 CH-P(M3) için (a) farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri, (b) Katodik ve anodik pik potansiyellerinin akıma göre değişimi, monomersiz 0,1 M LiClO₄/ACN içeren çalışma hücresinde

Başlangıç oksidasyon potansiyelinden faydalanılarak kompozit filmin HOMO ve LUMO değerleri sırasıyla -5,56 eV ve -2,6 eV olarak hesaplanmıştır.

7.1.3 CH-P(M3) Kompoziti İçin Stabilité Çalışması

CV iletken polimerlerin uzun vadeli kararlılığını yorumlayabilmek ve saptayabilmek için oldukça önemli ve pratik bir tekniktir. CV çalışmaları atmosferik şartlar altında, oda sıcaklığında, 250 mV/s tarama hızında ve -0,5 V ile 1,5 V potansiyel aralığında 200 döngü yapılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 7.3'te gösterildiği gibi CH-P(M3)'nın 1. döngüsü ile 200. döngüsü arasında fark % 12'dir. Yani iletken kompozit 200 döngü sonunda redoks stabilitesi % 88'dir.

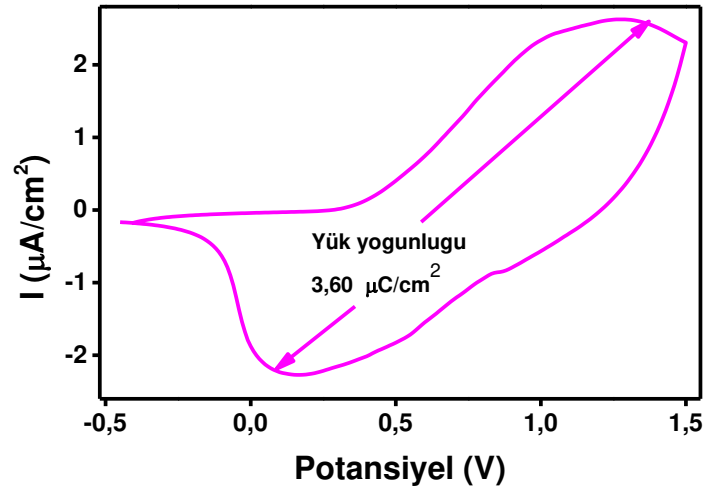


Şekil 7.3 CH-P(a-M3) için 250mV/s tarama hızında monomersiz 0,1 M LiClO₄/ACN ortamında 1. ve 200. dönüşümlü voltamogramlar

7.1.4 CH-P(M3) Kompoziti İçin Elektriksel Yük kapasitesi

Yük yoğunluğu (CD) genel olarak yüzey alanı başına katılanmış ya da katılanmamış iyon aktarımı için gerekli elektrik yükünün bir miktarı olarak ifade edilir. İletken polimerler için yük yoğunluğu iletken polimer filmin oksidasyon ve redüksiyon sırasında taşıdığı toplam elektriksel yük miktarı olarak ifade edilir.

Yük yoğunluğu (CD) çalışmaları için, ITO cam elektrot yüzeyinde oluşturulan CH-P(M3) kompozit filmi monomer içermeyen 0,1 M LiClO₄/ACN destek elektrolit-çözücü içeren hücrede, dönüşümlü voltametri tekniği vasıtasıyla 250 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir (Şekil 7.4). CH-P(M3)'nın yük yoğunluğu CV grafiğinin dönüşümlü voltamgramının integrali alınarak belirlenmiştir. CH-P(M3) kompozit filminin birim alan başına taşıdığı toplam yük 3,6 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 7.4 CH-P(M3) için 500 mV/s tarama hızında 0,1 M LiClO₄/ACN ortamında yük yoğunluğunu göstermek için alınmış dönüşümlü voltamogram

Tablo 7.1’de P(M3) için ve deneyler sonucunda elde edilen verilere göre CH-P(M3) için $E_{onset,ox}$, stabilite ve yük yoğunluğu (CD) değerleri özetle ve karşılaştırılmalı olarak verilmiştir (Soğancı, 2017). Üretilen kompozit malzemenin başlangıç oksidasyon potansiyeli P(M3)’ya göre daha büyüktür. ITO yüzeyindeki kitosan iletkin polimerin yapısına etki ederek P(M3)’nın oksidasyonu ve polimerleşmesi için gerekli başlangıç potansiyelini yükseltmiştir. Ayrıca kompozitin P(M3)’ya göre yük yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir ve bu kitosanın iletkin polimerin aktif redoks bölgelerini kapatmasından kaynaklanıyor olabileceği belirlenmiştir. Bunun yanında CH-P(M3) kompozit filminin iletkenliğinin P(M3)’nın iletkenliğinden daha düşük olduğu belirlenmiştir ve bu oksidasyon pik potansiyellerinin yüksek indirgenme pik potansiyellerinin düşük olmasının diğer bir sebebidir. P(M3)’nın CH-P(M3)’ya göre daha stabil olduğu görülmektedir.

Tablo 7.1 P(M2) ve CH-P(M2) için $E_{onset,ox}$, Stabilite ve CD değerleri

Malzeme	$E_{onset,ox}(V)$	Stabilite (%)	CD (mC/cm ²)
P(M3) ^a	0,62	92	2,2964
CH-P(M2)	0,81	83	0,0036

^a (Soğancı, 2017)

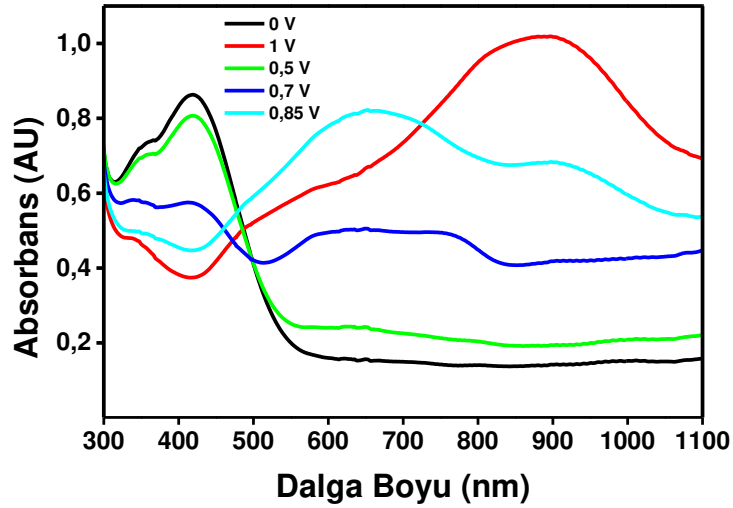
7.1.5 CH-P(M3)'nın Spektroelektrokimyasal ve Elektrokromik Özellikleri

Uygulanan voltaj değişimine bağlı olarak konjuge polimerlerin optik ve elektrokimyasal özelliklerini araştırmak için Spektroelektrokimya tekniği kullanılmaktadır. Spektroelektrokimya tekniği ile sentezlenen polimerin uygulanan potansiyeldeki optik özellikleri ve elektronik geçişleri gibi hususları araştırmak mümkündür. Bu çalışmalar daha önce ITO yüzeyinde sentezlenen polimerin belirli potansiyellerde monomer içermeyen destek elektrolit çözücü ortamında spektrumunun alınmasıyla gerçekleştirilmiştir.

CH ile modifiye edilmiş ITO elektrotu yüzeyi 30 sn boyunca 1,5 V 'da 0,02 M M3 monomeri içeren 0,1 M LiClO₄/ACN çalışma hücresinde P(M3) ile kaplanmıştır. Ardından monomer içermeyen elektrolit/çözücü ortamında 250 mV/s tarama hızında -0,5 V ile 1,5 V potansiyelleri arasında CH-P(M3)'nın UV spektrumları test edilmiştir. Uygulanan her potansiyel için dalga boyuna karşılık absorbans değişimi grafik ile gösterilmiştir (Şekil 7.5).

CH-P(M3) kompoziti için spektroelektrokimyasal çalışmalar ile nötral halde π - π^* geçişlerinin meydana geldiği dalga boyu belirlenmiş ve bu dalga boyundaki yasak enerji aralığı veya band boşluk enerjisi hesaplanmıştır. Ayrıca spektroelektrokimya çalışmaları sonucu çizilen grafik (Şekil 7.5) ile en yüksek absorbans farkının olduğu dalga boyları belirlenmiş ve bunlara bağlı olarak kinetik çalışmaları yapılmıştır.

HOMO-LUMO enerji seviyeleri arasındaki optik bant boşluğu enerjisi olarak ifade edilen E_g , π - π^* geçişlerinin olduğu dalga boyundaki başlangıç (onset) enerji absorpsiyonundan faydalanılarak hesaplanmıştır. π - π^* geçişlerinin olduğu dalga boyu CH-P(M3) için 425 nm olarak belirlenmiş ve bunlara bağlı olarak optik bant boşluk enerjisi (E_g) CH-P(M3) için 2,96 eV olarak belirlenmiştir. Uygulanan voltajın artmasıyla 890 nm de yük taşıyıcıların büyümesinden dolayı yeni absorpsiyon bandı (polaron-bipolaron geçişi) oluşumu gerçekleşmiştir.



Şekil 7.5 CH-P(M3)'ya ait spektroeletrokimya grafiği

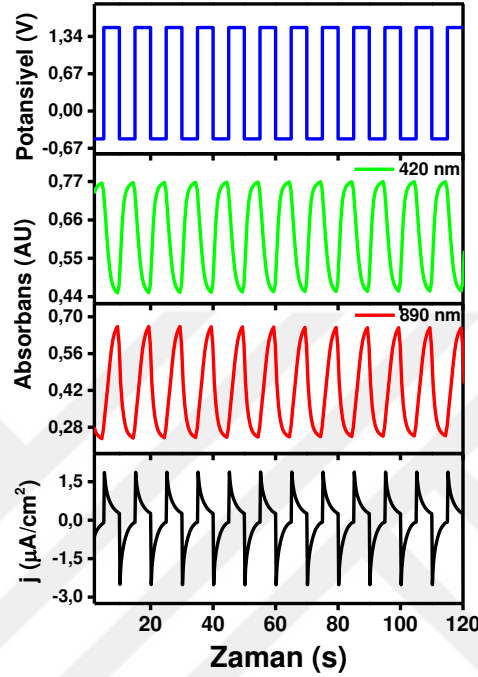
7.1.6 CH-P(M3) Kompoziti İçin Redoks Reaksiyon Kinetiği Çalışması

Elektrokimyasal uygulamalar için polimerin gözle görülür belirginlikte renk değişimi ve hızlı tepki verme yeteneğine sahip olması gerekir. Spektroeletrokimyasal testler sırasında elde edilen nötral durumda $\pi-\pi^*$ geçişlerinin meydana geldiği dalga boyunda, art arda tam renkli ve renksiz durum arasındaki geçişler ve tekrarlanan döngüler sırasındaki renksiz olma /renklenme prosesini anlayabilmek için kinetik çalışmalar yapılmış ve CH-P(M3)'nın elektrokromik tepki süresi bu çalışmalar vasıtasıyla en yüksek ve en düşük geçiş değerleri yardımıyla tespit edilmiştir. Kompozit malzemenin tepki süresi (switching time) ve optik kontrastı (ΔT %) en yüksek dalga boyunda (λ_{max}), monomersiz 0,1 M LiClO₄/ACN çalışma hücresi içerisinde ve UV-vis spektrofotometresi ile yapılan testlerle belirlenmiştir.

Kinetik çalışmaları spektroeletrokimyasal çalışmalardan elde edilen verilere göre yapılmıştır. Böylece iletken kompozit malzeme için indirgenme ve yükseltgenmenin meydana geldiği tersinir redoks reaksiyonun hızına bağlı olarak karakterizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla doğrultusunda spektroeletrokimyasal çalışmalardan faydalanılarak en yüksek absorbans farkının meydana geldiği dalga boyları ve potansiyel değerleri için P(M3)'nın redoks reaksiyon kinetiği çalışmaları yapılmıştır.

Kinetik çalışmaları için CH modifiyeli ITO elektrot yüzeyi 1,5 V'da M3 ile kaplanmış ve monomer içermeyen çözücü/destek elektrolit ortamında 420 nm ve 890 nm'de 5'er sn

aralıklarla -0,5 V (nötral durum) ile 1,5V (yükseltgenmiş durum) arasında değişen bir potansiyel uygulanarak deneyler yapılmıştır (Şekil 7.6). Buna göre CH-P(M3) için 420 nm'deki optik zıtlık % 29 ve tepki süresi 3,3 s olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 890 nm'deki optik zıtlık ve tepki süresi ise % 63 ve 2,2 s olarak tespit edilmiştir.



Şekil 7.6 CH-P(M3) için 0,1 M LiClO₄/ACN destek elektrolit çözümü sisteminde, 420 ve 890 nm'de Absorbans-Zaman grafikleri

Sonuç olarak yalıtkan özelliğe sahip CH iletken polimerin onset potansiyelini ve bant boşluğu enerjisini yükseltirken oluşan kompozit yapıda iletken polimerim konjuge çift bağlar arasında oluşan p-yığılaşmasını engelleyerek iyonik geçirgenliğini kolaylaştırarak optik kontrast ve tepki zamanını iyi yönde geliştirmiştir.

Tablo 7.2'de P(M3) ve CH-P(M3) ile ilgili optik ve elektrokimyasal veriler verilmiştir. Bu veriler karşılaştırıldığında kompozitin başlangıç oksidasyon potansiyelinin P(M3)'ya göre yüksek olduğu görülür. Maksimum dalga boyları çok yakın olmasına karşın kompozitin bant boşluk enerjisinin daha yüksek olduğu gözlenmektedir. P(M3)'nın optik kontrastı kompozite göre daha iyidir ve tepki süresi daha kısadır. Sonuç olarak yalıtkan özelliğe sahip CH iletken polimerin onset potansiyelini ve bant boşluğu enerjisini yükseltirken oluşan kompozit yapıda iletken polimerim konjuge çift bağlar arasında oluşan p-yığılaşmasını engelleyerek iyonik geçirgenliğini kolaylaştırarak optik kontrast ve tepki zamanını iyi yönde geliştirmiştir.

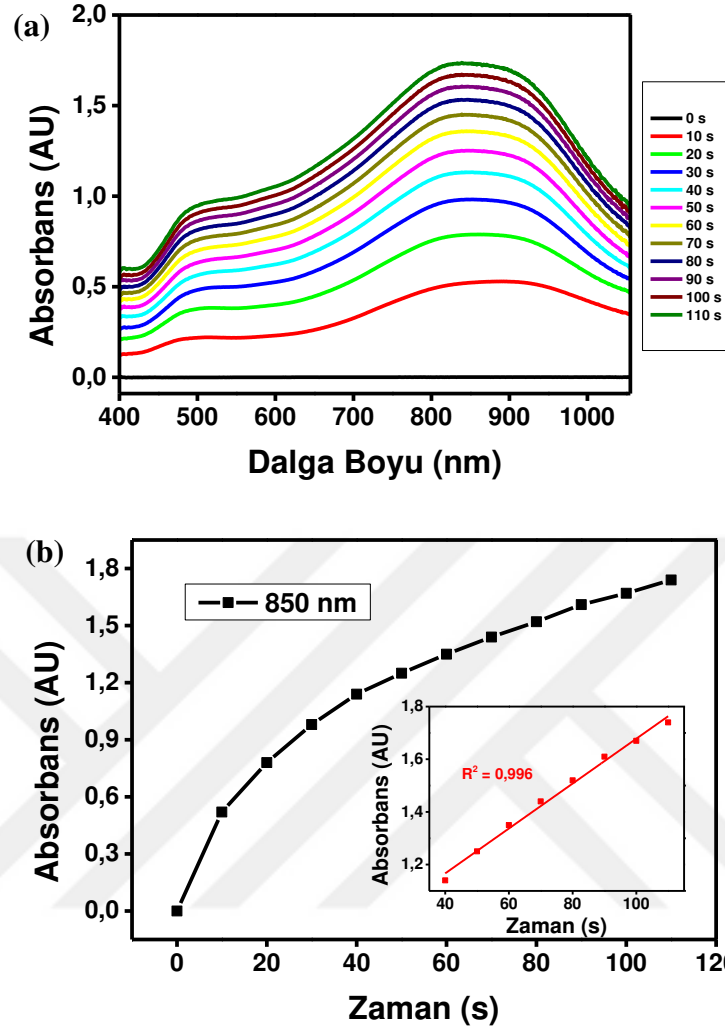
Tablo 7.2 P(M1) ve CH-P(M1) için optik ve elektrokimyasal veriler

Malzeme	E _{onset,ox} (V)	λ_{max} (nm)	E _g ^{op} (eV)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Optik Zıtlık (%ΔT)	Tepki Süresi (s)
P(M2)^a	0,62	900	2,28	-4,28	-2,14	52	1,5
CH-P(M2)	0,81	890	2,96	-5,56	-2,6	63	2,2

^a (Soğancı, 2017)

Spektroelektrokimyasal ve kinetik çalışmaların yanında potansiyometrik ve spektroskopik metotlar birleştirilerek elde edilen CH-P(M3) kompozitinin elektrokromik ve optik özellikleri zamana bağlı olarak araştırılmıştır. Bu amaçla 0,02 m M3 monomeri ve 0,1 M LiClO₄/ACN içeren çalışma hücresi UV-vis spektrofotometresine yerleştirilip spektrumları alınmıştır. Potansiyostat ve spektroskopi eş zamanlı çalıştırılmış ve potansiyometri cihazından 1,5 V sabit potansiyel uygulanarak testler yapılmıştır. 10'ar saniye aralıklarla polimerin yüzeye elektrokimyasal olarak kaplanmasına ilişkin absorbans değerleri tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere bağlı olarak polimerizasyon boyunca dalga boyuna karşı absorbans değişimi grafik ile gösterilmiştir (Şekil 7.7 (a)). Bu grafik baz alınarak 110 saniye boyunca zamana karşı belirlenen dalga boyu olan 850nm'deki absorbans değerleri grafiğe geçirilerek Şekil 7.7 (b)'de gösterilmiştir. Absorpsiyon süreci 40 s'den 110 s'ye değişen zaman aralığında absorbans değişimi lineerdir ve bu zaman aralığında elektrokimyasal prosesin difüzyon kontrollü değildir

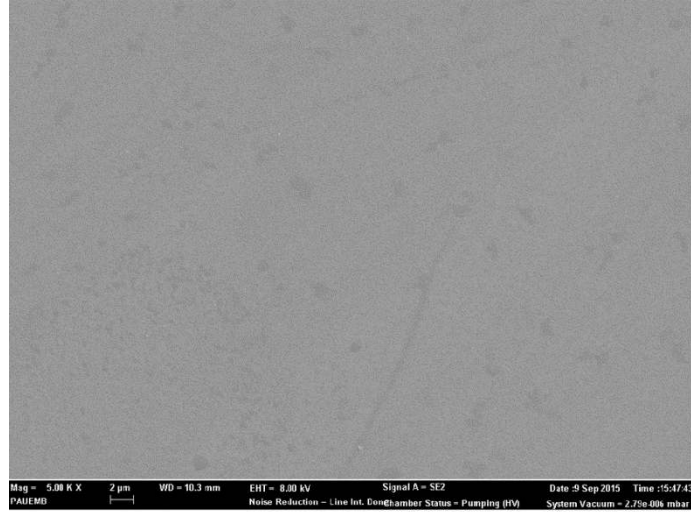


Şekil 7.7 (a) CH-P(M3) için UV-vis spektrumları, (b) CH-P(M3) için 850 nm’de zamana bağılı absorbans değışim grafiğı

7.1.7 ITO Elektrotu Yüzeyindeki CH-P(M3) Kompozitinin Morfolojik Karakterizasyonu

CH-P(M3) kompozit filminin morfolojik karakterizasyonunu yapmak için ITO cam elektrot yüzeyi öncelikle CH ile modifiye edilmiş ve ardından sabit 1,5 V potansiyelde, 30 s boyunca, 0,1 M LiClO₄/ACN içeren ortamda M3 monomerinin elektrokimyasal olarak polimerleştirilmesiyle oluşan P(M3) ile kaplanmıştır. Oluşan yüzeyi analiz edebilmek için her aşamanın ayrı ayrı SEM fotoğrafı alınmıştır.

Şekil 7.8 ‘te boş ITO kaplı cam elektrot yüzeyi gösterilmiştir. Yüzey homojen ve düz bir görünüme sahiptir.



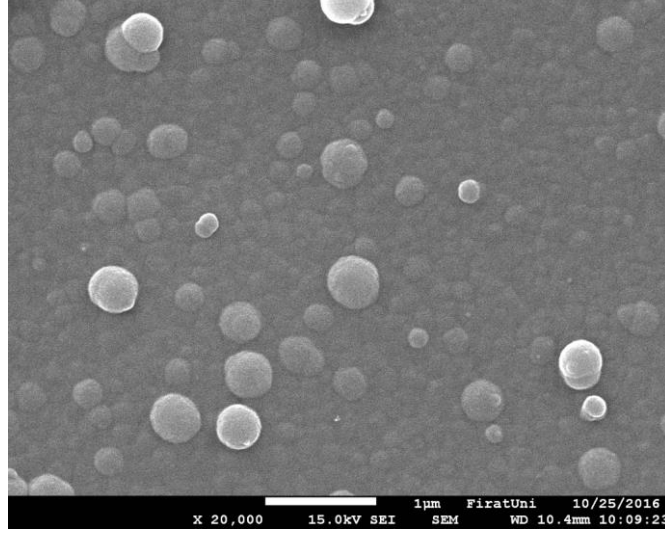
Şekil 7.8 Boş ITO kaplı cam elektrot (5000 x)

Elektrot yüzeyi CH ile kaplandıktan sonra alınan SEM fotoğrafı Şekil 7.9’da gösterilmiştir. Önceki bölümde de bahsedildiği gibi CH bir biyo-malzemedir ve ortam koşullarına karşı hassastır. Yüksek büyültmelerde yüzeye yoğun bir biçimde elektron gönderilmektedir ve bu CH’nin bozulmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle yüzeyin en fazla 5000 kez büyültme ile kaliteli görüntüsü alınabilmektedir. Kitosan iyi film oluşturan bir malzemedir ve şekilde de görüldüğü gibi oldukça düz, homojen ve pürüzsüz bir yapı oluşturmuştur.



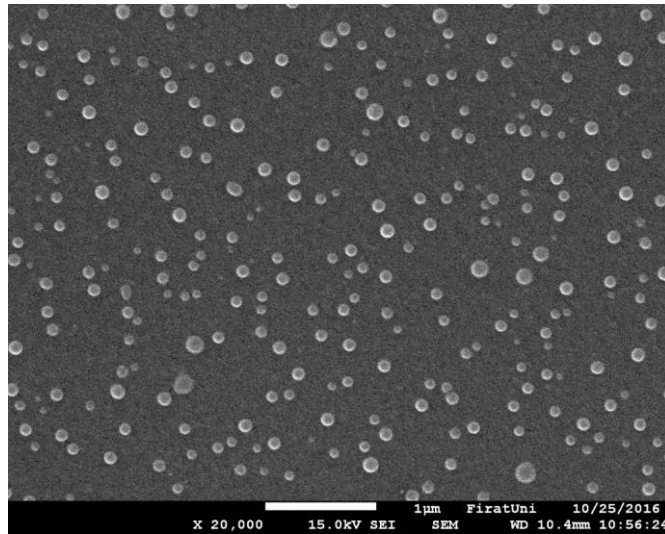
Şekil 7.9 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde CH için SEM görüntüsü (5000 x)

Oluşturulan kompozit biyo-iletken kompozit malzemenin yüzeyini yorumlayabilmek için öncelikle ITO cam elektrotu yüzeyi sadece 1,5 V sabit potansiyelde 30 s kaplanarak elde edilen P(M3) iletken polimer filmi varlığında SEM fotoğrafı alınmıştır. P(M3)’nın yüzeyi Şekil 7.10 ‘de gösterildiği gibi taneciklidir ve homojen değildir.



Şekil 7.10 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde P(M3) için SEM görüntüsü (20000 x)

Elektrot yüzeyi önce CH ve sonra P(M3) ile kaplanarak elde edilen CH-P(M3) kompoziti her iki malzemenin yüzey karakteristiğini taşımaktadır (Şekil 7.11). Ancak yüzeyde CH bulunduğunda tanecikler daha küçülmüş ve azalmıştır. Bu CH ince filminin yüzeyde elektron iletimini zorlaştırması ve daha az polimerin yüzeye kaplanmasına sebep olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca elektrot yüzeyi sadece CH ile kaplıyken malzemenin çok hassas olması sebebiyle yüksek büyültmelerde kaliteli SEM görüntüsü alınamamıştır. Ancak CH yüzeyi P(M3) ile kaplandıktan sonra kaliteli SEM fotoğrafı alınması kolaylaşmıştır. Yüzey görüntülerinin benzer olması CH katmanının P(M3) katmanının ITO elektrodu arasında bağlayıcı modifiye yüzey oluşturarak ve P(M3) için plastikleştirici etki yaparak stabilitesini artırırken yüzey özelliklerinde çok büyük bir farklılığa neden olmamaktadır.



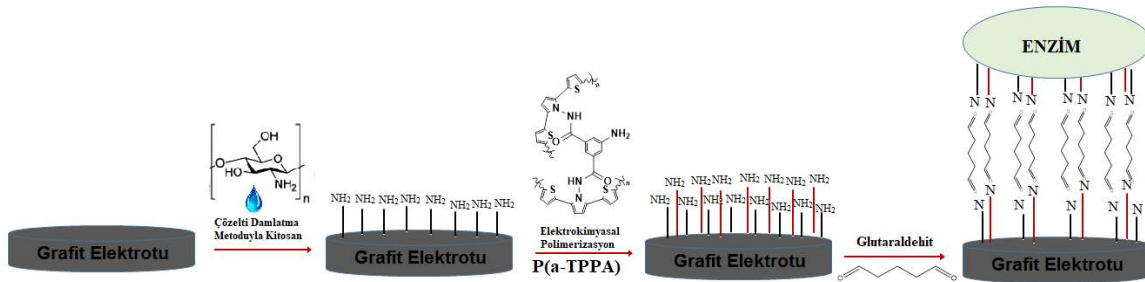
Şekil 7.11 ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde CH-P(M3) için SEM görüntüsü (20000 x)

7.2 CH-P(M3) Kompozit Filminin Biyosensör Özellikleri

Kitosan gibi doğal polimerler ve iletken polimerler gibi farklı stratejiler immobilizasyon platformu oluşturmak için kullanılırlar. Zincirinin esnek olması ve NH_2 grupları sebebiyle pozitif yüklenebilme özelliği kitosanı biyosensör uygulamaları için oldukça uygun bir matris ve katkı malzemesi haline getirmektedir. İletken polimerlerin elektriksel iletkenliği sensör sistemlerinde matris olarak bu malzemeleri dikkat çekici hale getirmektedir.

CH ve P(M3)'nın özellikleri birleştirilerek GOx glikoz biyosensör immobilizasyon platformu oluşturulmuştur. Kitosan ve iletken polimer kullanılarak biyomolekül (enzim) ve polimer immobilizasyon platformu arasındaki güçlü bağlar vasıtasıyla kararlı ve stabil bir biyolojik tanılama platformu oluşturmak amaçlanmıştır. CH-P(M3) kompoziti kullanılarak oluşturulan glikoz biyosensör immobilizasyon platformunun optimizasyonu ve karakterizasyonu ilerleyen bölümlerde anlatılmıştır. Tezin en önemli çıktılarından birisi çok kolay bir yöntemle kitosan/iletken polimer kompozitinin hazırlanarak iletken polimerlerin optik ve elektriksel özelliklerinin yanında stabilitesinin önemli ölçüde artırılmasıdır.

Şekil 7.12'de CH-P(M3) kompoziti ile grafit çalışma elektrotu yüzeyinde oluşturulan glikoz oksidaz enzim immobilizasyon platformunun üretim aşamaları gösterilmiştir. Grafit elektrot yüzeyi enzimi yüzeye tutuklayabilmek için aktif NH_2 gruplarına sahip biyoyumlu bir biyopolimer olan kitosan ile kaplanmıştır. Elektron alışverişini kolaylaştırmak, sensörden elde edilecek sinyal gücünü arttırmak ve stabil bir sensör üretebilmek için yüzey iletken polimer P(M3) ile elektrokimyasal yolla kaplanmıştır. P(M3) iletken olmasının yanında NH_2 gruplarına sahiptir. Yani P(M3) elektrot yüzeyindeki elektron transferini kolaylaştırmanın yanında immobilizasyon işleminde de görev almaktadır.



Şekil 7.12 Biyosensör elektrotunun üretimi

M3 monomeri elektrokimyasal olarak CH ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyinde polimerleştirilmiştir. Bu işlem 0,02 M M3 ve 0,1 M LiClO₄/ACN içeren bir hücrede grafit elektrot yüzeyi 30 s boyunca sabit 1,5 V potansiyel ile elektrokimyasal olarak kaplanarak gerçekleştirilmiştir.

Biyosensörün çalışma prensibi ortamda glikoz bulunduğu durumda enzimin katalitik aktivitesine bağlı olarak tüketilen oksijen miktarının hesaplanmasına dayanır. Enzimin yüzeye kovalent olarak bağlanması için iki fonksiyonlu çapraz bağlayıcı glutaraldehit kullanılmıştır. Glutaraldehit enzim ve CH-P(M3)'nın amin grupları arasında kovalent bağlanmanın gerçekleşmesi için çapraz bağlayıcı görevi görür.

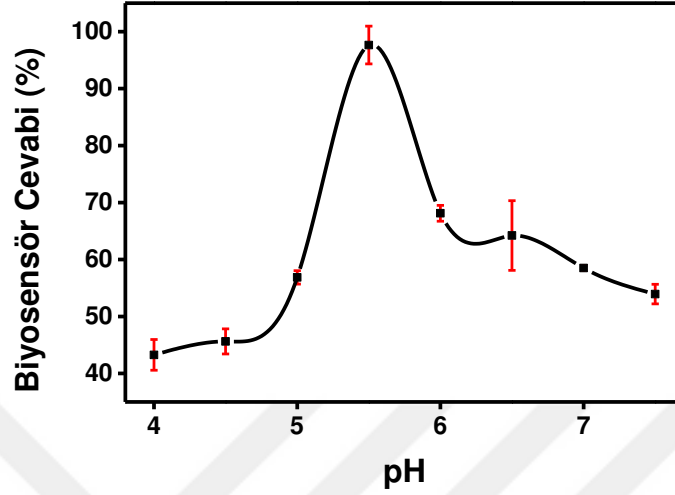
7.2.1 CH-P(M3)-GOx Glikoz Biyosensörü için pH Optimizasyonu

Doğru pH değerinde çalışmak biyosensörün enzim aktivitesini veya hazırlanan yüzeye biyosensörün cevabını izlemek için oldukça önemlidir. Çözeltinin pH değeri hazırlanan biyosensör platformunun sensör cevabına etki ettiği için en yüksek akım farklılığının alındığı optimum pH değerinde çalışılması gerekir. CH-p(M3) glikoz biyosensörünün çalışma koşullarını belirlemek amacıyla pH optimizasyonu yapılmıştır. Böylece hazırlanan biyosensör için en uygun pH değeri tespit edilmiştir ve sonraki deneysel çalışmalar belirlenen pH değerine sahip tampon çözeltide gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla pH değeri 4 ve 7,5 arasında değişen 8 tampon çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu tampon çözelti ortamlarında biyosensör cevapları karşılaştırılmıştır. Bu amaçla 10 ml tampon çözelti içeren 3 elektrotlu amperometrik test hücresi hazırlanmış ve Ag/AgCl referans elektrotuna karşı CH-P(M3) kompoziti ile hazırlanmış enzim çalışma elektrotundan gelen akım stabil olana kadar beklenmiştir. Kararlı bir akım elde edildiğinde ortama 25 µl 0,1 M'lık glikoz çözeltisinden eklenmiş ve elde edilen akım farkı kaydedilmiştir.

Çeşitli pH değerleri için biyosensörün nispi cevabı Şekil 7.13'de gösterilmiştir. Maksimum cevap pH 5,5 değerinde elde edilmiştir. Bu nedenle optimum pH değeri 5,5 olarak kabul edilmiştir. Biyosensör fabrikasyonunda kullanılan negatif veya pozitif yüklü gruplar içeren immobilizasyon matrisi (CH ve P(M3)) çalışma hücresinde kullanılacak olan tampon

çözeltilinin çalışma pH değeri önemli ölçüde sensör cevaplarına etki edebilmektedir. Dolayısıyla optimum pH değeri biyosensör fabrikasyonunda kritik bir yere sahiptir.



Şekil 7.13 CH-P(M3) biyosensörü üzerinde pH etkisi (0,1 M sodyum fosfat tamponu içerisinde, -0,7V)

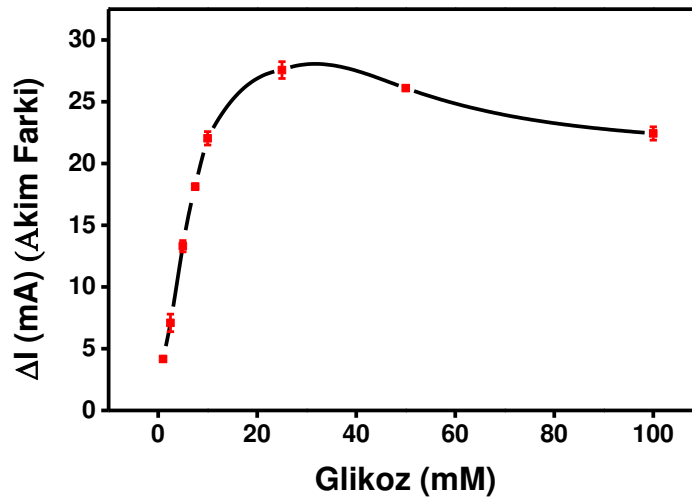
Elektrot yüzeyi 10 µl CH ile modifiye edildikten sonra 1,5 V sabit potansiyelde, pH 5,5 ‘ta 10 s, 30 s ve 40 s süreyle elektrokimyasal olarak P(M3) ile kaplanarak hazırlanan sensör elektrotunun cevabı araştırılmıştır (Tablo 7.3). 30 saniyenin altında ve üstünde yapılan elektrokimyasal polimerizasyon ile üretilen elektrotların cevabının düşük olduğu gözlenmiştir. En yüksek sensör cevabı (27,57 mA) ise 30 s süreyle P(M1) ile kaplanmış elektrottan elde edilmiştir. Elektrot yüzeyi düşük sürelerde kaplandığında yani yüzeyde daha ince bir iletken polimer tabakası oluşturulduğunda yüzeyde elektron iletimini sağlayacak yeterli iletken polimer bulunmamasından ve elektrot yüzeyindeki fonksiyonel grupların azalmasından dolayı sensör cevabı da düşük olabilir. Bunun yanında elektrot yüzeyinde çok fazla iletken polimer biriktirildiğinde ve nispeten daha kalın bir iletken polimer tabakası oluşturulduğunda yüzeyde bir difüzyon bariyeri oluşmasından kaynaklanan bu daha düşük yük taşıma oranı sensör cevabının düşük olmasına sebep olabilmektedir. Ayrıca sensör yüzeyinde daha kalın bir iletken polimer tabakası oluşturulduğunda CH’nin aktif bölgeleri kapanacağından enzim immobilizasyonu zorlaşır. Özetle bu deneyde P(M3)’nin film kalınlığı polimerleşme süresi ile kontrol edilerek en yüksek sensör cevabının alındığı film kalınlığı optimize edilmiştir. Sonuçlar Tablo 5.3’de özetlenmiştir.

Tablo 7.3 1,5 V sabit potansiyelde elektropolimerizasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Polimerizasyon Süresi (s)	Sensör Cevabı (Ma)	Standart Sapma
10	10,84	0,76
20	16,18	0,61
30	27,57	0,68
40	12,97	0,55

7.2.2 CH-P(M3)-GOx Glikoz Biyosensörü için Kalibrasyon Çalışmaları

Biyosensör cevabının glikoz konsantrasyonuna bağlılığını araştırmak amacıyla pH 4'te 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde sabit -0,7 V potansiyelde farklı konsantrasyonlardaki glikoz çözeltileri ile testler gerçekleştirilmiştir. Glikoz konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen akım farkı değerleri kalibrasyon grafiğinde (Şekil 7.14) gösterilmiştir. 1 mM'dan 100 mM'a kadar olan glikoz konsantrasyonları için sensörün verdiği cevap (akım farkı (mA)) değerleri tespit edilmiştir. 25 mM' kadar olan glikoz konsantrasyonlarında akım farkı sürekli artarken 25 mM'dan sonra akım farkı artışı azalmıştır. Daha ötesi glikoz konsantrasyonu artışıyla birlikte yüksek konsantrasyonlarda sensörün verdiği cevap düşmüştür.



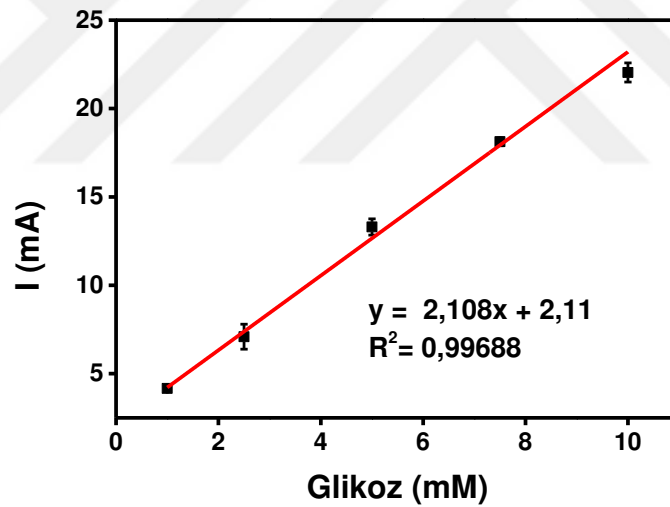
Şekil 7.14 CH-P(M3) enzim elektrotu için kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,0, -0,7V). Hata çubukları üç ölçüm sonucunda elde edilen standart sapmayı gösterir.

Biyosensör grafiğinde sensörün lineer olarak cevap verdiği bölge oldukça önemlidir. Çünkü daha sonra yapılacak gerçek örnek vb. testlerde lineerlik grafiğinden elde edilen denkleme

göre analit tayini yapılmıştır. Ayrıca lineerlik sınırı içerisinde bir analitik konsantrasyonda çalışma hücresine glikoz eklenmiştir.

CH-P(M3) biyosensörü pH 5,5'da 1 mM ve 10 mM glikoz konsantrasyonları için lineer olarak cevap vermiştir (Şekil 7.15). 10 mM'dan sonra biyosensörün cevabı lineer olarak değişmemektedir. Lineer bölge için elde edilen denklem $y = 2,108x + 2,11$ şeklindedir ve burada y akım farkını (sensörün cevabı – (mA)) ve x ise glikoz konsantrasyonunu mM cinsinden göstermektedir.

Ticari amaçlı kandaki şeker tespiti amacıyla kullanılan sensörlerin lineerlik sınırı vücuttaki glikoz konsantrasyonu olan 15 mM'dır (Harper, 2005). CH-P(M3) enzim biyosensörünün lineerlik sınırı 10 mM'dır ve pratik canlı içi (in vivo) kullanım için uygun değildir. Ayrıca artan glikoz miktarına karşı CH-P(M3)'ün verdiği lineer sürekli hal cevabı etkili bir glikoz oksidasyonu meydana geldiğini göstermektedir.

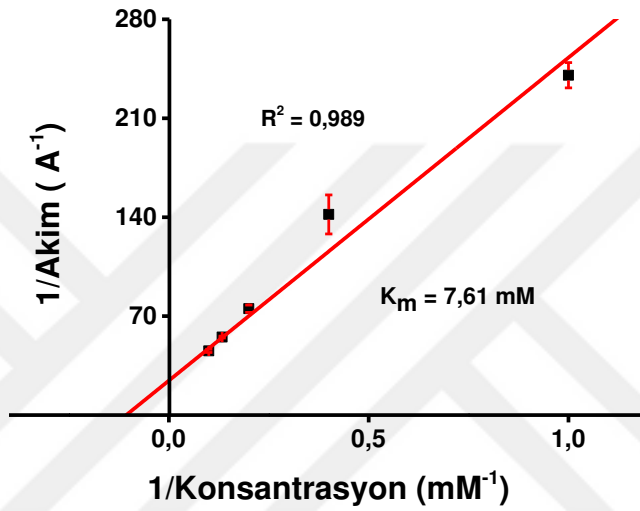


Şekil 7.15 CH-P(M3) biyosensörü için lineer kalibrasyon grafiği (0,1 M sodyum fosfat çözeltisinde, pH 5,5, - 0,7V). Hata çubukları üç ölçüm sonucunda elde edilen standart sapmayı gösterir.

Gözlenebilme sınırı (LOD) farklı biyosensörleri karşılaştırmak için iyi bir metottur. Önceki bölümde anlatıldığı gibi CH-P(M3) lineer kalibrasyon grafiğinden (Şekil 7.15) faydalanılarak LOD değeri 0,4 mM olarak belirlenmiştir.

Enzimler reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandıran maddelerdir. Glikozun parçalanma reaksiyonu için glikoz oksidaz (GOx) enzimi kullanılır. Yani glikozun oksidasyonu GOx enziminin katalizörlüğü aracılığıyla gerçekleşmektedir. Reaksiyonun hızı

veya kinetiği hakkında yorum yapabilmek için Michaelis-Menten sabiti ' K_m ' değeri bilinmelidir. K_m değeri tersinir ve tersinmez reaksiyonu sabitidir ve reaksiyon kinetiği hakkında yorum yapabilmek için önemli bir parametredir. Lineweaver–Burke metodu daha materyal ve metot bölümünde anlatıldığı gibi K_m değerinin tespit etmenin en kolay ve pratik yollarından biridir. Lineweaver–Burke grafiği (Şekil 7.16) yardımı ile 7,61 mM olarak tespit edilmiştir. K_m değerinin küçük olması GOx enzimi tarafından glikozun daha iyi okside olduğunu gösterir.



Şekil 7.16 CH-P(M3) enzim elektrotu için Lineweaver–Burke grafiği

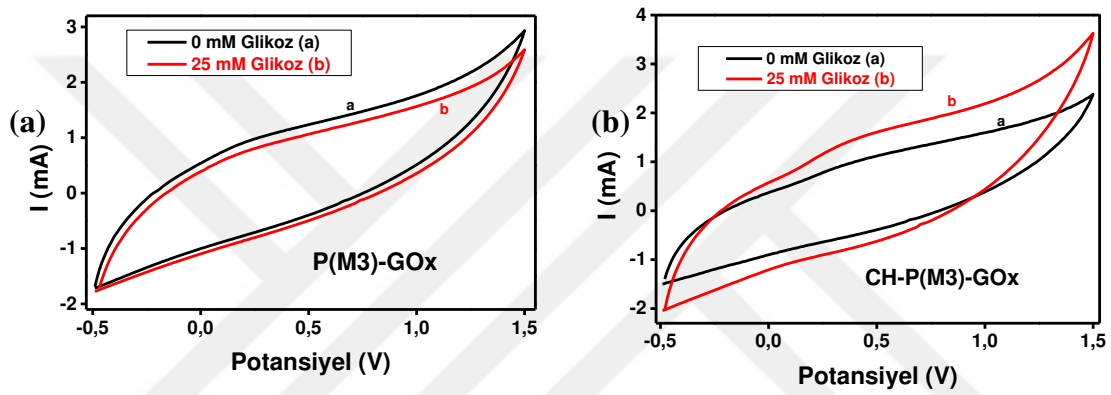
7.2.3 CH-P(M3)-GOx Glikoz Biyosensörü ile Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

Dönüşümlü voltametri tekniği glikozun GOx enzimi tarafından oksidasyonunu takip etmek amacıyla kullanılmıştır. CV testleri -0,5 ve 1,5 V potansiyel aralığında pH'ı 5,5 olan 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde 250 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çalışma elektrotu çalışma hücreinde 5 dk bekletildikten sonra önce hücreye glikoz eklenmeden ardından hücreye 25 mM glikoz enjekte edilip bir dakika karıştırıldıktan sonra CV ile test edilmiştir.

P(M3) ile elektrokimyasal olarak kaplanmış grafit elektrotunun yüzeyine GOx enzimi immobilize edilerek hazırlanan çalışma elektrotu ile ortamdaki glikozun etkisini araştırmak amacıyla CV çalışması yapılmıştır (Şekil 7.17 (a)). Çalışma hücreinde glikoz yokken ve 25 mM glikoz varlığında yapılan CV çalışmasında 2,94 mA ve 2,60 mA maksimum akım

değerlerine ulaşılmıştır. Ortamda glikoz varken ulaşılan en yüksek akım değeri glikozun bulunmadığı ortamdaki maksimum akım değerine göre daha düşüktür.

CH-P(M3)-GOx çalışma elektrotu ile yapılan CV çalışmalarında ortamda glikoz yok iken ve ortama glikoz enjekte edildiğine sırasıyla 2,40 ve 3,63 mA maksimum akım değerine ulaşılmıştır. P-(M3)'dan farklı olarak ortamda glikoz bulunmadığında ulaşılan en yüksek akım değeri ortama glikoz eklendikten sonra ulaşılan maksimum akım değerinden daha küçüktür. Bu glikozun oksidasyonu sebebiyle akım değerinin arttırdığı şeklinde yorumlanabilir.

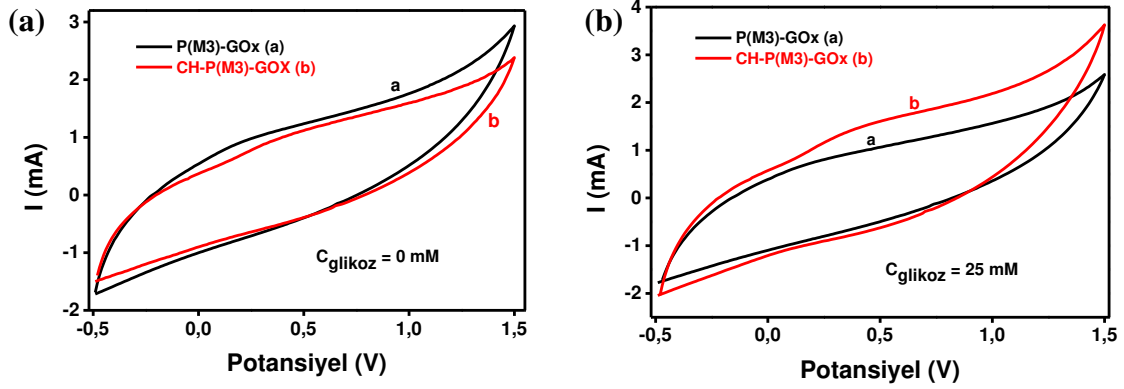


Şekil 7.17 Grafit elektrot yüzeyine (a) P(M3)-GOx ile kaplanıp, (b) CH-P(M3)-GOx ile kaplanıp çalışma hücrelerine glikoz eklenmeden ve 25 mM glikoz eklenerek yapılan CV çalışmaları. (0,1M sodyum fosfat içerisinde, pH 5,5, tarama hızı 0,025 V/s, Ag/AgCl referans elektrotuna karşı)

P(M3)-GOx ve CH-P(M3)-GOx çalışma elektrotlarının karşılaştırılması için CV çalışmaları yapılmıştır. Ortamda glikoz yokken her iki elektrot ile yapılan CV çalışmalarında P(M3)-GOx çalışma elektrotu ve CH-P(M3)-GOx elektrotu ile sırasıyla 2,94 ve 2,40 maksimum akım değerine ulaşılmıştır (Şekil 7.18 (a)). Yani ortamda glikoz yokken CH iletkenliği düşürdüğü için P(M3)-GOx çalışma elektrotunun maksimum akım değeri daha yüksektir. Ortamda glikoz yokken glikoz oksidasyonu söz konusu değildir ve sadece polimerin yükseltgenip indirgenmesi meydana gelir. Daha önce yapılan elektrokimyasal çalışmalarda da gösterildiği gibi elektrot CH ile kaplandığında elektriksel iletkenliği düşürür ve yapıya etki eder. Bunlara bağlı olarak P(M3)-GOx biyo-elektrotunun daha yüksek bir akım değerine ulaştığı söylenebilir.

Ortama glikoz enjekte edildiğinde P(M3)-GOx ve CH-P(M3)-GOx çalışma elektrotları için sırasıyla 2,60 ve 3,63 mA maksimum akım değerlerine ulaşılmıştır (Şekil 7.18 (b)). CH ile etkin bir enzim immobilizasyonu gerçekleştirildiğinden ortama glikoz eklendiğinde daha

fazla glikoz parçalanır. Bu nedenle maksimum akım değerinde bu açık yükseliş gerçekleşmiştir.

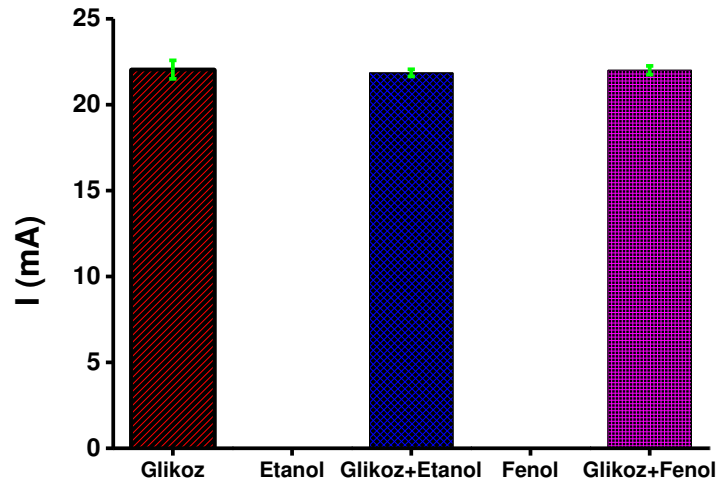


Şekil 7.18 Grafit elektrot yüzeyine (a) P(M3)-GOx ile kaplanıp çalışma hücresine glikoz eklenmeden, (b) CH-P(M3)-GOx ile kaplanıp çalışma hücresine 25 mM glikoz eklenerek yapılan CV çalışmaları. (0,1M sodyum fosfat içerisinde, pH 5,5, tarama hızı 0,025 V/s, Ag/AgCl referans elektrotuna karşı)

7.2.4 CH-P(M3)-GOx Glikoz Biyosensörüne Girişimci Etkisi

Biyosensörün seçiciliği ortamda bulunduğu biyosensörün cevabını etkileyen maddeler ile yardımıyla araştırılmıştır. Hazırlanan biyoelektrot kullanılarak çalışma hücresine girişimci madde enjekte edildiğinde sensörün nasıl bir cevap verdiği incelenmiştir. Girişimci testleri biyosensör elektrotunun çalışma hücresinde pH 5,5’da 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde yapılmıştır. Biyosensör çalışma hücresine glikoz olmadan ve glikoz ile birlikte belirlenen miktarda (25 mM) girişimci madde enjekte edilmiş ve sensörün verdiği cevap incelenmiştir.

Şekil 7.19’da çalışma hücresine aynı anda 0,1 M’lık girişimci çözeltisinden (fenol veya etanol) 25 mM, girişimci ve glikoz çözeltisinden aynı anda eşit miktarda (25 mM glikoz ve girişimci) enjekte edildiğinde CH-P(M3) glikoz enzim sensörünün verdiği cevap gösterilmiştir. Grafikte de gösterildiği gibi ortamda etanol ya da fenol bulunduğu sensörde herhangi bir cevap gözlenmemiştir. Bunun yanında girişimci ve glikoz birlikte ortama enjekte edildiğinde de sadece glikoz için beklenen sensör cevabı elde edilmiştir. Yani etanolün ve fenolün CH-P(M3) glikoz biyosensörü üzerinde girişimci etkisi yoktur ve hazırlanan biyosensörün glikoz için seçiciliği test edilen girişimciler karşısında oldukça iyidir.



Şekil 7.19 CH-P(M2)-GOx glikoz biyosensörüne ortamdaki girişimci etkisi (pH 4, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda, hata çubukları 3 test sonucu elde edilen standart sapmayı ifade eder)

7.2.5 CH-P(M3)-GOx Glikoz Biyosensörü ile Gerçek Örneklerde Glikoz Tayini

CH-P(M3)-GOx glikoz biyosensörü ile üç farklı ticari içecekteki glikoz miktarı başarılı olarak tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Testler pH 5,5'te 0,1 M sodyum fosfat tamponu içerisinde yapılmıştır ve çalışma hücreğine eklenen glikoz miktarı (10 mM) lineerlik sınırı içinde bulunur. Böylece CH-P(M3)-GOx biyosensörü için çizilen lineer kalibrasyon grafiği vasıtasıyla gerçek örneklerdeki glikoz miktarına ulaşılmıştır.

Kola, meyve suyu ve gazoz için biyosensörün cevabı sırasıyla 3,909, 3,855 ve 2,089 iken spektroskopik yöntemle elde edilen sonuçlar sırasıyla 3,635, 4,212 ve 2,377'dir. Spektroskopik yöntem ile elde edilen sonuçla hazırlanan CH-P(M3)-GOx glikoz biyosensörü arasındaki benzerlik kola, meyve suyu ve gazoz için sırasıyla % 93, 109 ve 114'dür. Bu sonuçlara bakılarak hazırlanan biyosensörün ticari pratik uygulamalar için uygun olduğunu göstermektedir.

Tablo 7.4 CH-p(M1) biyosensörü kullanarak ve spektrofotometrik yöntemi kullanarak içecekler içerisindeki toplam glikoz miktarının saptanması sonuçları

Numune	Glikoz(mM)*		
	CH-p(M1)	Spektrofotometrik	Benzerlik %
Kola	3,909 ± 0,217	3,635 ± 0,003	93
Meyve suyu	3,855 ± 0,480	4,212 ± 0,013	109
Gazoz	2,089 ± 0,057	2,377 ± 0,005	114

*Sonuçlar en az üç testin ortalamasıdır ± standart sapmadır.

7.2.6 CH-P(M3)-GOx Biyoelektrotunun Stabilitesi

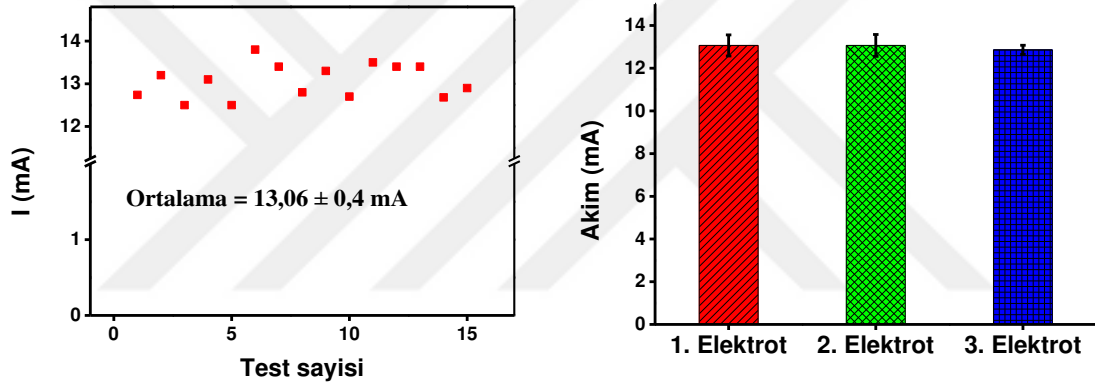
Biyosensör tasarımında en önemli noktalardan biri sensörün tekrarlanabilir, stabil ve uzun ömürlü olmasıdır. Bu özellikleri taşıyan bir sensör elektrotunun ticarileşmesi ve pratik kullanıma uyarlanması daha kolaydır. Uzun süre stabil kalabilen bir biyoelektrot sayesinde sensör tasarımının en önemli konusu olan maliyet düşürülebilir. Ayrıca hazırlanan her elektrot ile kararlı bir biçimde hata sınırları dahilinde benzer cevaplar alındığında tasarlanan sensörün fabrikasyonu yapılabilir.

Enzimler reaksiyona girip reaksiyon hızını arttırarak reaksiyondan değişmeden çıkan maddeler olarak tanımlanırlar. Ancak enzimler reaksiyona hızlandırmakla görevli olup reaksiyon sonucunda oluşan ürünlerin yapısına katılmadıkları halde reaksiyonun sonunda yorulabilir veya işlevleri azalarak kaybolabilir. Ayrıca immobilizasyon matrisi de uygulanan potansiyelden, ortam ve çevre koşullarından etkilenerek işlevsiz hale gelebilir.

Hazırlanan CH-P(M3)-GOx biyoelektrotu ile elde edilen sonuçların tutarlı ve kararlı olup olmadığı öncelikle araştırılmıştır. Aynı elektrot ile 0,1 M sodyum fosfat tamponu içeren ve pH'ı 5,5 olan hücrede ortama 5 mM glikoz eklenerek art arda 15 test yapılmıştır (Şekil 7.20 (a)). Biyosensörün bu testler sonucunda verdiği cevabın ortalaması $13,06 \pm 0,4$ mA olmuştur. Art arda yapılan bu testlerde sensörün cevabında çok büyük sapmalar gözlenmemiştir.

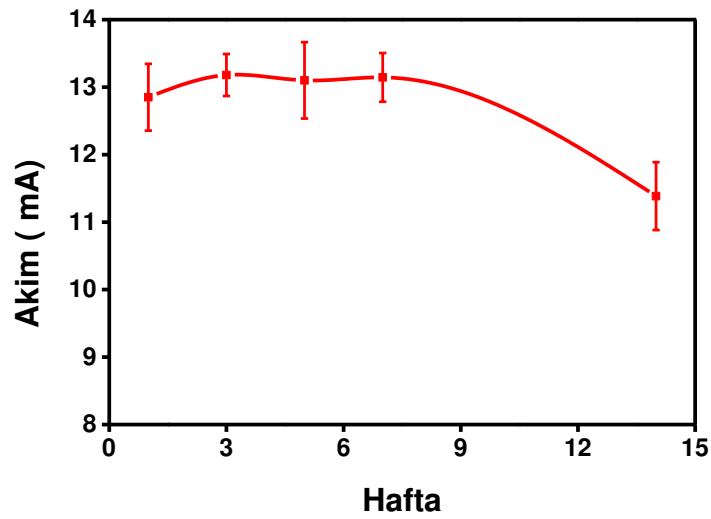
Tek bir elektrot ile 50 teste kadar deneme yapılabilmiştir. Çalışma için gerekli tüm deneyler yapıncaya kadar 3 elektrot kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensör elektrotunun tekrarlanabilirliğini araştırmak için ayrı ayrı aynı şartlar altında hazırlanan bu üç elektrot

kullanılarak testler yapılmıştır. Çalışma hücreesine 5 mM glikoz eklenerek her bir biyoelektrotun verdiği cevap izlenmiş ve yaklaşık olarak her üç elektrotun aynı cevapları verdiği gözlenmiştir (Şekil 7.20 (b)). Bu sonuca göre aynı şartlarda hazırlanan CH-P(M3)-GOx enzim platformlarının eklenen glikoz'a karşı aynı cevapları verdiği yani tekrar kalibrasyona gerek duymayan oldukça kararlı ve sürekli enzim platformlarının hazırlanabileceğini göstermiştir. Literatürde genellikle hazırlanan her elektrot için farklı kalibrasyon hazırlanması gerektiğinden CH-P(M3)-GOx enzim platformlarının ticari uygulamalar için oldukça stabil sonuçlar verdiği görülmektedir. Sonuç olarak kitosan içeren P(M3) enzim platformundan oldukça stabil ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir. Bu enzim platformunun farklı enzim ve substratlar için stabil ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebileceğini göstermektedir.



Şekil 7.20 CH-P(M3)-GOx için (a) Biyoelektrotun art arda yapılan testlere verdiği cevap, (b) Tekrarlanabilirlik (çalışma hücreesine 5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 5,5’de)

Çalışmalarda kullanılmış olan elektrotlardan biri çalışma tampon çözeltisi içerisinde (pH 5,5 ve 0,1 M sodyum fosfat tamponu) ve 4 °C ‘de saklanmış ve 14 hafta boyunca test edilmiştir (Şekil 7.21). Hazırlanan CH-P(M3)-GOx biyoelektrotu 7 hafta boyunca aynı kararlılıkta glikozu cevap vermiştir. Ancak 7. hafta sonunda biyoelektrot işlevini yitirmeye başlamıştır. Bu sonuç enzim platformunun raf ömrünün oldukça iyi olduğunu ve ticari uygulamalar için oldukça elverişli olduğunu göstermektedir.



Şekil 7.21 CH-P(M3)-GOx için Stabilité çalışması (7,5 mM glikoz enjekte edilerek, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde, pH 4’de)

Tablo 7.5’de P(M3) ve CH-P(M3) ile oluşturulan GOx immobilizasyon platformunun 25 mM glikoz çalışma hücrene enjekte edildiğinde verdiği cevaplar gösterilmiştir. Burada yalnız P(M3)’nin de enzim platformu olarak görev yapabildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile P(M3)’nin elektron iletimini kolaylaştırmanın yanında enzim sensörünün cevabına da katkı sağladığı ispatlanmıştır. Ancak CH ile P(M3)’nin yalnız oluşturdukları enzim elektrotuna nazaran CH-a(TPPA) kompoziti olarak oluşturdukları enzim elektrotunun hem glikozu verdiği cevap (27.57 mA) daha yüksektir hem de sonuçlar daha tutarlı ve biyoelektrot daha kararlıdır. Bu da hazırlanan kompozit bileşenlerinin biyosensör uygulamaları için sinerjik bir etki yaptığını göstermektedir. Kompozit yapı içerisindeki kitosan üzerindeki amin grupları ile enzimin stabil bir şekilde immobilize edilmesini sağlarken iletken polimer için de plastikleştirici etki ile iyon geçişini dolayısıyla elektriksel özelliklerini artırarak biyokimyasal reaksiyon sonucundaki akım farklılığının artmasına sebep olmaktadır.

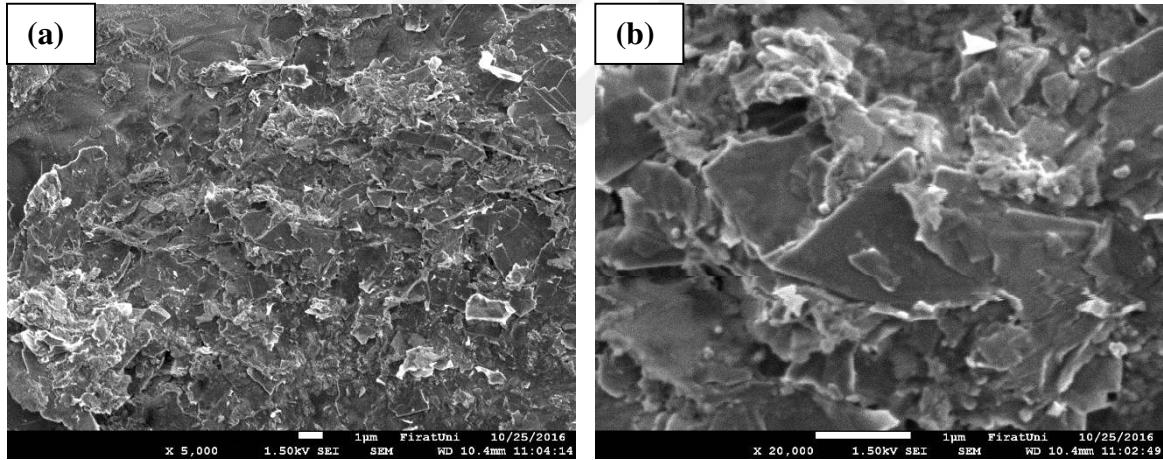
Tablo 7.5 P(M3) ve CH-P(TPPA) enzim immobilizasyon platformları (n = test sayısı, 0,1M sodyum fosfat tamponunda, pH 5’te, çalışma hücrene 25mM glikoz enjekte edilerek)

İmmobilizasyon Platformu	Biyosensör Cevabı (mA)	Standart Sapma
P(M2)-GOx-GAL	14,42	± 0,52 (n=5)
CH-P(M3)-GOx-GAL	27,57	± 0,68 (n=10)

7.2.7 Grafit CH-P(M3)-GOx Biyoelektrotunun Morfolojik Karakterizasyonu

Her maddenin yüzey yapısı farklıdır ve maddeler arasında etkileşim olduğunda yüzeyde değişimler meydana gelebilir. Enzim elektrotu hazırlanırken grafit elektrotunun yüzeyi hazırlanmış, yüzey CH ile modifiye edilmiş, bu yüzeye elektrokimyasal yolla P(M3) ardından oluşturulan kompozitin yüzeyine glutaraldehit aracılığıyla enzim immobilize edilmiştir. Tüm aşamalar gerçekleştirilirken en baştan en sona kadar elektrot yüzeyindeki yapısal değişiklikler SEM ile takip edilmiştir.

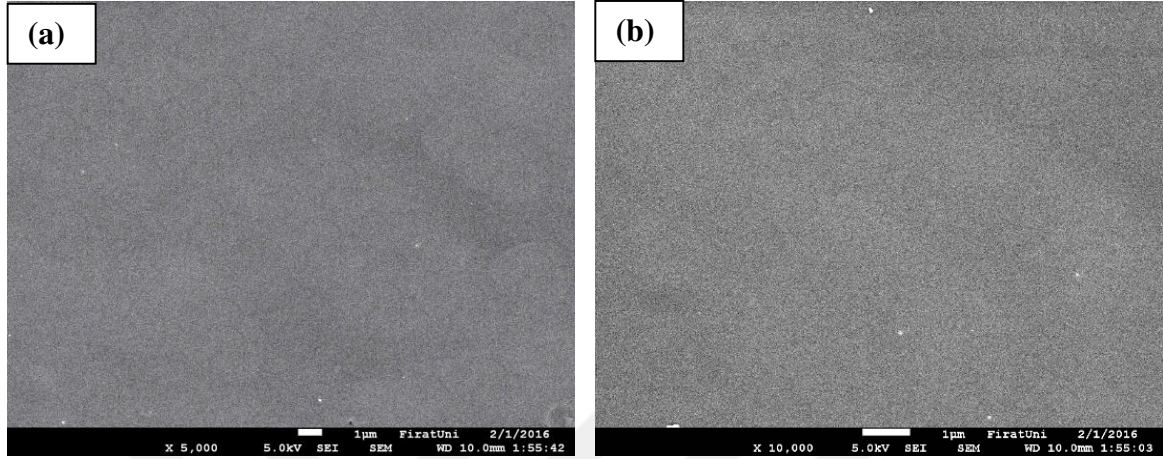
Biyosensör çalışmalarında grafit elektrot kullanılmış ve her kullanımda elektrot yüzeyi parlatılmış ve temizlenmiştir. Şekil 7.22 (a)'da 5000 ve (b)'de 20000 kez büyütülerek kullanıma hazır olan boş grafit elektrot yüzeyinin SEM görüntüleri gösterilmiştir. Elektrotun çok tabakalı grafit yaprakları açıkça her iki resimde de görülmektedir.



Şekil 7.22 Boş grafit elektrot için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

Grafit üzerinde biyosensör katmanları oluşturmaya kitosan ile başlanmıştır. Daha önce belirtilmiş olan prosedüre göre grafitin yüzeyi CH ile kaplanmış ve bu yüzeyi karakterize etmek için SEM fotoğrafları alınmıştır. Şekil 7.23 (a)'da 5000 ve (b)'de 10000 kez büyütülmüş CH kaplı elektrot yüzeyi görülmektedir. CH elektrot yüzeyini bir örtü gibi kaplamış pürüzsüz ve düz bir görünüm kazandırmıştır. Her iki fotoğrafta da benzer bir yapı görülmektedir. Oluşan yapı grafit yüzeyinden tamamen farklı olan bir yapıdır. CH bir biyopolimer malzemedir ve görüntü almak için yoğun bir biçimde gönderilen elektronlar yapısına zarar vermektedir. Bu nedenle büyütme oranı arttıkça SEM ile görüntü alımı

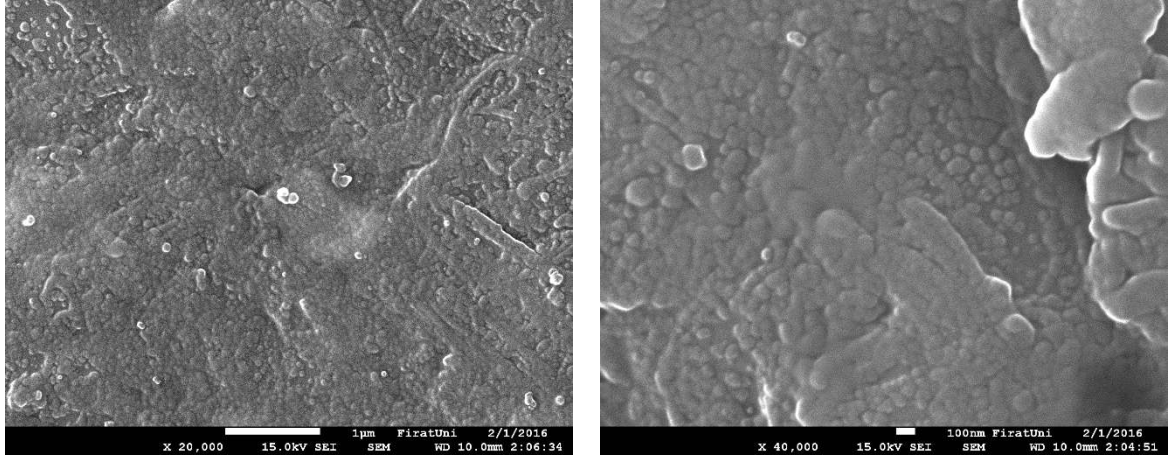
zorlaşmakta ve yüzeydeki CH gözle görünür bir biçimde bozunup yanmaktadır. Bundan dolayı en fazla grafit elektrotu üzerinde CH'nin 10000 büyötmeye kadar olan görüntöleri alınabilmiştir.



Şekil 7.23 CH ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyötmüş, (b) 10000 kez büyötmüş SEM görüntöleri

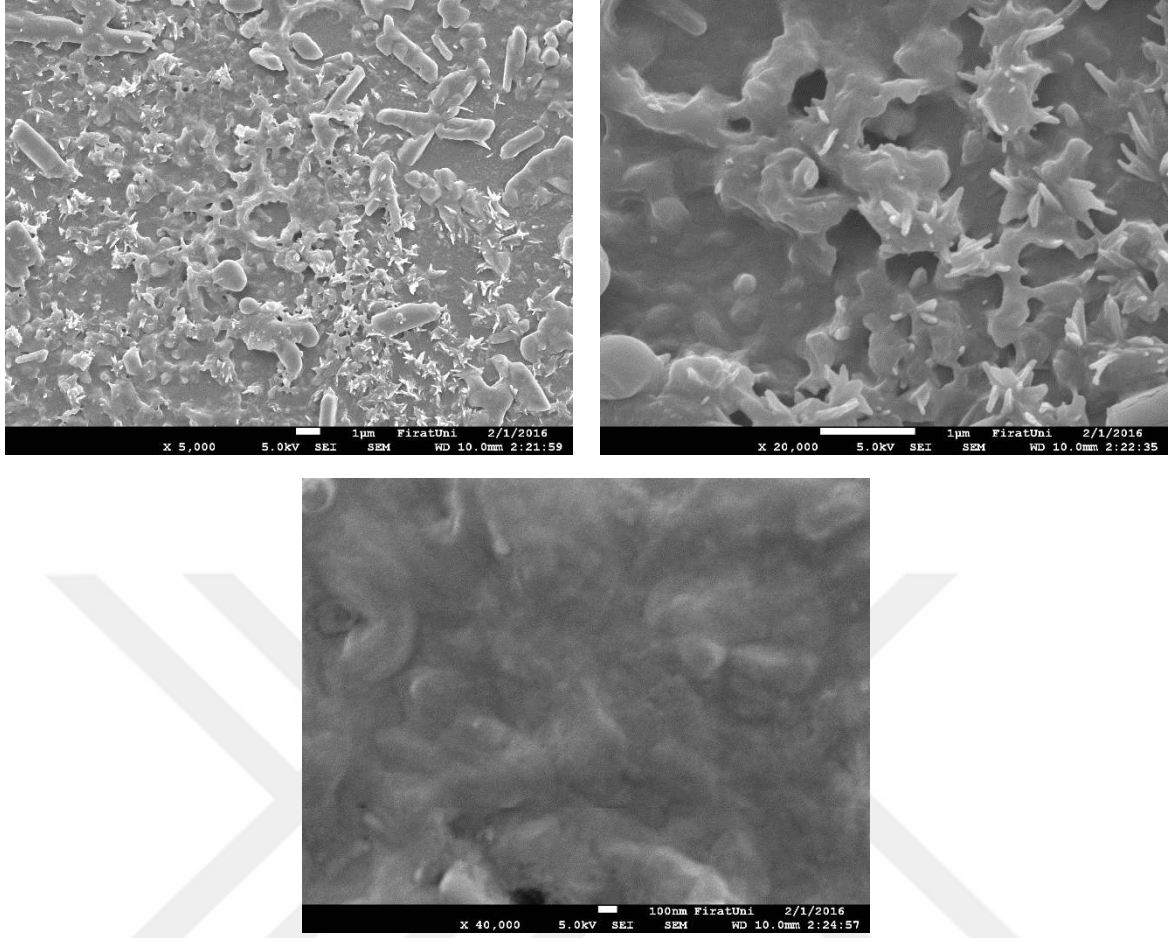
İletken polimerin grafit elektrot yüzeyindeki morfolojisi hakkında bilgi sahibi olmak CH ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyinde ki iletken polimeri karakterize etmede yol gösterici olacaktır. Bu nedenle grafit elektrot yüzeyi 0,1 M LiClO₄/ACN ve 0,02 M M3 monomeri içeren hücrede 1,5 V sabit potansiyelde 30 s boyunca elektropolimerizasyon ile elektrot yüzeyine kaplanmış ve SEM görüntöleri alınmıştır.

P(M3) ile elektrokimyasal olarak kaplanmış grafit elektrotunun sırasıyle 20000 ve 40000 kez büyötmüş yüzey görüntöleri gösterilmiştir (Şekil 7.24 (a) ve (b)). 20000 kez büyötmüş resimde tabakalı grafit yüzeyinin tamamen P(M3) ile örtöldüğü ve yüzeyde uzayan tanecikli yapılar görölmektedir. Bu yapılar 40000 kez büyötmüş görüntöde daha belirgindir. Ayrıca P(M3) tanecikleri kendi arasındaki π - π etkileşimlerinden dolayı kümelenmiş yoğun polimer birikintileri oluşturmuşlardır



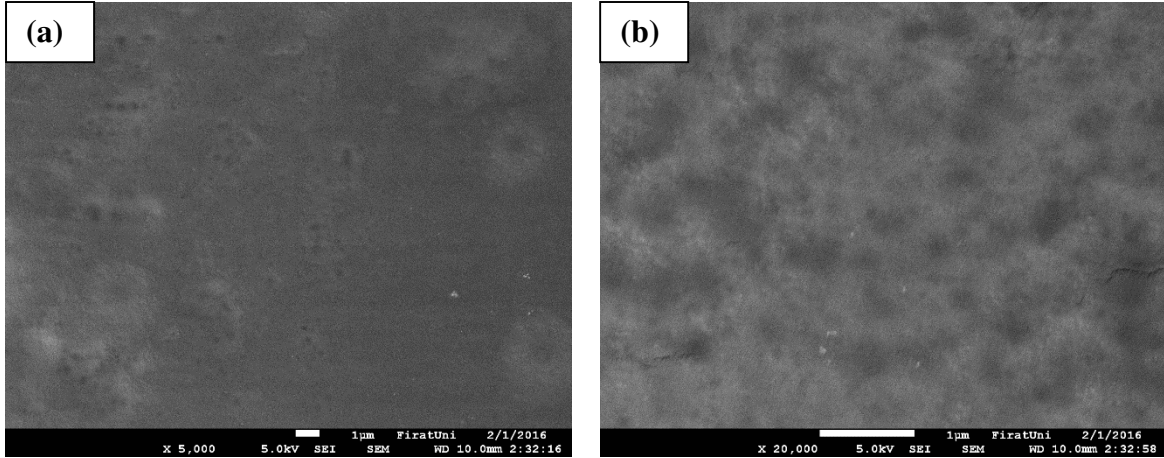
Şekil 7.24 P(M2) ile kaplanmış Grafit elektrotu için SEM görüntüleri (a) 20000, (b) 40000 kez büyütülmüş

Grafit elektrot yüzeyi önce damlatma metoduyla CH ile kaplanmış ve ardından elektrokimyasal olarak P(M3) ile kaplanmıştır. Grafit elektrot yüzeyinde elde edilen bu biyo-iletken-kompozit malzemenin Şekil 7.25 (a), (b) ve (c)'de sırasıyla 5000, 20000 ve 40000 kez büyütme için alınmış SEM görüntüleri verilmiştir. Elektrot tabanındaki pürüzsüz ve düz CH'ye ait yapı görülmektedir. Elektrot yüzeyinde yer yer kümelenmiş halde bulunan uzun yapılar P(M3)'ya aittir. Ancak P(M3)'ya ait olduğu düşünülen yapılar tanecikli halden sapmış ve uzamışlardır. Bu CH'nin sahip olduğu aktif gruplar ile P(M3)'nın yapısındaki NH_2 grupları arasında meydana gelmiş olan bir etkileşimden kaynaklanabilir. Ayrıca sadece CH ile kaplı olan yüzeyde SEM görüntüsü almakta sıkıntı yaşanan zorluklar P(M3) ile yüzeyin kaplanması sonrasında azalmıştır. Bu oluşan P(M3)'nin yapıyı daha stabil hale getirdiği şeklinde yorumlanabilir.



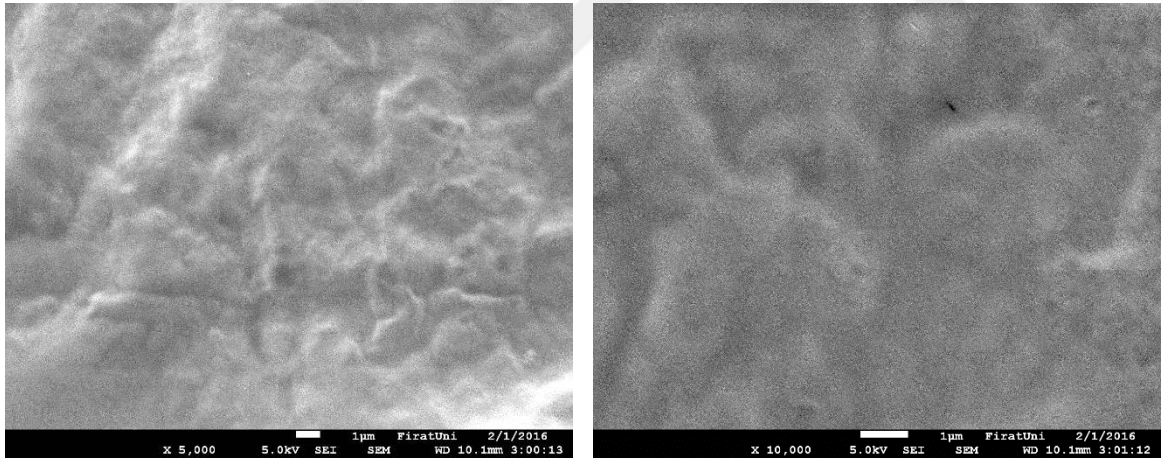
Şekil 7.25 CH-P(M3) ile kaplanmış Grafit elektrotu için SEM görüntüleri (a) 5000, (b) 20000 ve (c) 40000 kez büyütülmüş

CH ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyine glutaraldehit (GAL) aracılığıyla GOx enzimi immobilize edildikten sonra SEM görüntüleri alınarak biyoelektrotun morfolojik özellikleri karakterize edilmiştir (Şekil 7.26 (a) ve (b)). CH ve GOx biyolojik malzemelerdir ve SEM ile görüntülemeye yüksek oranlardaki büyültmelerde yüzey elektron bombardımanı sonucu yanmaktadır. Bu nedenle en fazla 20000 kez büyültme yapılarak elektrot yüzeyi görüntülenebilmiştir. Enzim yüzeye uniform bir biçimde dağıtıldıktan sonra GAL çapraz bağlayıcısı yardımıyla CH ile amid bağları oluşturur ve bundan dolayı Şekil 7.26 (b)'de daha net görüldüğü gibi sarmal bir düzen oluşmuştur. Bu görüntü elektrot yüzeyindeki CH ve enzim arasında çapraz bağlanmanın gerçekleştiğinin ve enzimin elektrot yüzeyine immobilize edildiğinin ispatıdır.



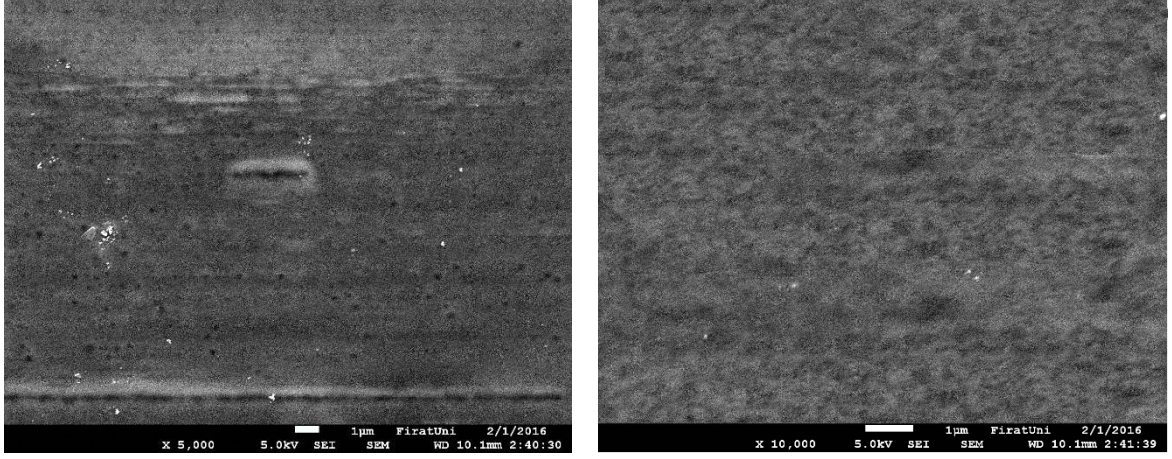
Şekil 7.26 CH-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000 kez büyütülmüş, (b) 20000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

Sadece P(M3) ile kaplı grafit elektrot yüzeyine de enzim immobilize edilmiştir. Bu yüzeyin morfolojik özelliklerini araştırmak için SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 7.27 (a) ve (b)). Yüzeyde büzüşmüş bir örtü görünümü vardır ve sarmal yapılar oluşmuştur. Bu yapının oluşmasının sebebi elektrot yüzeyinde P(M3) ile enzim ve glutaraldehit arasında etkileşimlerin meydana gelmesi ve bağların oluşmasıdır.



Şekil 7.27 P(M3)-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için SEM görüntüleri (a) 5000, (b) 10000 kez büyütülmüş

Bu çalışmada hedeflenen CH-P(M3) üretmek ve üretilen bu kompozit matrisin yüzeyine enzim immobilize etmektir. Hedeflenen bu biyoelektrotun yüzeyine ait SEM görüntüleri Şekil 7.28 (a) ve (b)'de sırasıyla 5000 ve 1000 kez büyültme ile verilmiştir.



Şekil 7.28 CH-P(M3)-GOx-GAL ile kaplanmış Grafit elektrotu için (a) 5000, (b) 10000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri

8 SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tezin amacı yeni ve basit bir yöntem kullanarak kitosan içeren iletken polimer sentezleyerek iletken ve biyouyumlu bir kompozit malzeme üretmek, hazırlanan bu kompozitin elektrokimyasal ve elektrokromik uygulamalar için özelliklerini ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde araştırmak ve sensör olabilme özelliklerini grafit elektrot yüzeyinde araştırmaktır. Elektrokimyasal polimerizasyon tekniğini kullanarak kompozit oluşturma yöntemi literatürde bulunmamaktadır ve bu çalışma ile literatüre kazandırılmıştır. ITO yüzeyinde oluşturulan kompozit malzemelerin indirgenme ve yükseltgenme redoks reaksiyon davranışları, spektroeletrokimyasal özellikleri ve redoks reaksiyon kinetiği gibi özellikleri incelenmiştir. Bunun yanında grafit elektrot yüzeyindeki kompozit yüzeyine GOx enzimi immobilize edilerek enzim immobilizasyon platformu oluşturulmuş, bu enzim elektrotunun glikoz tespitinde kullanılabilmesi için optimizasyonu yapılmış, optimize edilmiş şartlar altında kararlılığı, girişimci maddelere karşı seçiciliği ve gerçek örneklerle verdiği cevaplar incelenmiştir. Bu kompozitler ile hazırlanan elektrotların yüzeyleri SEM ile görüntülenmiş ve meydana gelen morfolojik değişimler incelenmiştir.

Hazırlanan kompozitlerin elektrokimyasal özellikleri dönüşümlü voltametri tekniği ile CH ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine elektroaktif monomerin elektropolimerizasyon ile kaplanması suretiyle araştırılmıştır. Başlangıç oksidasyon potansiyelinin (on-set) reaksiyonun aktivasyon enerjisi ile ilişkili olduğu düşünülecek olursa polimerizasyon reaksiyonun başlaması için en fazla potansiyel gereksinimi 0,81 ile CH-P(M3)'ya, ikinci olarak 0,76 ile CH-P(M1) ve en az potansiyel gereksinimi 0,66 ile CH-P(M2) aittir. Ayrıca dönüşümlü voltametri çalışmaları sonucunda oluşturulan grafiklerde de görüleceği gibi artan döngülerle birlikte konjuge 2,5-di(2-tiyenil)pirol sayısı artmış ve bu akım yoğunluğunu da arttırmıştır. Ayrıca oluşan polimer zinciri büyümüş çapraz bağlanma oranı artmış ve artan döngülerle birlikte polimerizasyon kolaylaşmıştır. Akım yoğunlukları kıyaslandığında en iyi polimerleşmenin sırasıyla CH-P(M1), CH-P(M3) ve CH-P(M2)'de gerçekleştiği söylenebilir. Bunun yanında akım yoğunluklarının ve başlangıç oksidasyon potansiyellerinin her bir kompozit için farklı olması monomerlerin kimyasal yapısına ve bu yapıdaki sterik engellere bağlıdır. Bunların yanı sıra kitosanın elektroaktif bir malzeme olmaması ve sahip olduğu -OH grupları ile iletken polimerlerin yapısında bulunan -NH₂ grupları arasında etkileşimin mümkün olması her bir kompozitin başlangıç oksidasyon

potansiyelinin bir miktar daha artmasına ve akım yoğunluğunun ise düşmesine sebep olmuştur.

Her bir kompozit için yük yoğunluğu dönüşümlü voltametri tekniği ile monomer bulunmayan çalışma hücresinde araştırılmış ve en yüksek değer CH-P(M1) kompozit malzemesi ile ardından CH-P(M3) ve en düşük değer CH-P(M2) ile elde edilmiştir. Bu CH ile P(M2) arasındaki etkileşimden ve yapısal değişiklikler meydana gelmesinden kaynaklanabilir. Tarama hızına karşı pik akım değerinin grafiğe geçirilmesiyle her bir kompozit malzeme için elde edilen lineer eğriler kompozitlerin yükseltgenme ve indirgenme redoks reaksiyonlarının tersinir olduğunu ve difüzyondan bağımsız olarak gerçekleştiğini ispatlarlar.

Ayrıca kitosan-iletken polimer kompozitleri spektroeletrokimyasal ve kinetik çalışmalarla optik kontrast (%T) tespit edilmiş, band boşluk enerjileri hesaplanmıştır. Tablo 8.1’de elektrokimyasal, spektroeletrokimyasal ve kinetik çalışmalarla elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

Tablo 8.1 ITO elektrotu üzerinde üretilen kompozitlerin elektrokimyasal ve spektroeletrokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması

Kompozit	$E_{\text{onset-ox}}$ (V)	E_g (eV)	ΔT (%)	CD (mC/cm ²)	Stabilite (%)	λ_{max} (nm)	t_s (s)
CH-P(M1)	0,76	2,89	81	1,79	94	900	1,6
CH-P(M2)	0,66	2,92	74	0,00074	84	885	2,8
CH-P(M3)	0,81	2,96	63	0,0036	83	890	2,2

ITO yüzeyinde üretilen kompozit malzemelerin SEM ile morfolojik karakterizasyonu yapılmıştır. SEM görüntülerinde CH, iletken polimer ve boş ITO’nun kendine has yüzey karakterine sahip oldukları gözlenmiştir. Oluşturulan kompozitler ile alınan SEM görüntülerde yapının kitosan ve iletken polimere benzer yeni bir yapı olduğu ortaya konulmuştur. Bu yapı yüzeyde üretilmesi hedeflenen kitosan/iletken polimer (CH/CP) kompozitlerinin her birinin oluşturulabildiğinin ispatıdır.

Dünya genelinde diyabet hastalarının sayısı her geçen gün artmaktadır ve diyabet dünyanın önde gelen, yaygın ve güncel sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu nedenle kandaki glikoz miktarının tayini ya da gıdaların içerdiği glikoz miktarının tayini her zaman güncelliğinin koruyan bir konu olmaya devam etmektedir. GOx enzim immobilizasyon platformlarının tasarlarken aklımızda olan sorulardan bazıları şunlardı:

- Biyouyumlu bileşenlerle biyosensör tasarımı yapabilir miyiz?
- Bu malzemelerin biyosensör üzerinde etkisi ne olur?
- Yeni metodumuz ile üreteceğimiz CH/CP kompozitlerimiz enzim immobilizasyon platformu olarak kullanılabilir mi?
- Enzim immobilizasyonunda kullanılacak matrisin biyosensörün kullanım ömrüne etkisi olur mu?
- Tasarlanan enzim elektrotlarının glikoza vereceği cevap ne büyüklükte olur?

Bu soruların cevabını aramak amacıyla grafit elektrotu üzerinde ITO elektrotu üzerinde oluşturulan kompozitlerin aynısı hazırlandı. Grafit elektrotu ile yapılan CV testinde daha yüksek akım yoğunluğu değerlerine ulaşıldığı kaydedildi. Bu nedenle sensör çalışmaları grafit elektrot üzerinde yürütüldü.

Grafit elektrot üzerinde öncelikle CH-P(M1) kompoziti M1 monomerinin CH ile modifiye edilmiş grafit elektrot üzerine elektrokimyasal polimerizasyonu ile kaplanması yoluyla üretildi. Üretilen bu elektrot yüzeyine GOx enzimi GAL vasıtasıyla immobilize edildi. Ardından bu biyoelektrotun optimizasyonu pH, ve kalibrasyon testleriyle yapıldı. Böylece biyosensörün optimum çalışma koşulları tespit edildi. Çalışma pH'ı immobilizasyon matrisinin durumundan etkilenir bu nedenle tespiti oldukça önemlidir. Üretilen bu biyosensöre etanolün ve fenolün girişim etkisi yoktur ve biyoelektrotun stabilitesi iyidir. Ayrıca gerçek örneklerle yapılan testler spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve sonuçların benzerliğinin iyi olduğu gözlenmiştir. SEM ile elektrotların morfolojik karakterizasyonu yapılmıştır. Kompozit oluşumu SEM görüntüleri aracılığıyla elektrot yüzeyinde gözlenebilmektedir. Ayrıca enzim immobilizasyonundan sonra yüzeyde büzüşmeye benzeyen sarmal yapılar oluşmuştur. Bu enzim immobilizasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir.

Çalışma kapsamında üretilen ikinci biyosensör CH-P(M2)-GOx glikoz biyosensörüdür. Öncelikle sensörün çalışma koşulları optimize edilmiştir. Ardından girişimci testleriyle etanol ve fenolün girişim etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Sensörün stabilitesi birinci biyosensöre göre orta düzeydedir. Gerçek testlerden elde edilen sonuçlar spektroskopik metotla karşılaştırıldığında benzerlik düzeyinin iyi olduğu gözlenir. SEM ile yapılan morfolojik karakterizasyon aracılığıyla yüzeyde kompozit olduğu ve enzimin immobilize edildiği oluşan yapılarla ispatlanmaktadır. Bu sensörün lineerlik sınırı 15 mM'dır ve bu kandaki glikoz miktarının tayin edilebilmesi için gerekli fizyolojik glikoz alt sınırıdır. Yani bu sensör ile kandaki glikoz tayini yapılabilir.

Hazırlanan son biyosensör ise CH-P(M3) matrisine GOx immobilize edilerek üretilen glikoz biyosensörüdür. Diğer biyosensörler ile yapılan optimisasyon ve karakterizasyon çalışmaları bu biyosensör ile de yapılmıştır. Sensörün stabilitesi ve seçiciliği iyidir. Gerçek örneklerle yapılan testlerde elde edilen sonuçlar spektroskopi yöntemiyle kıyaslandığında benzerlik oranı iyidir.

Tablo 8.2'de Üretilen üç biyosensör için yapılan optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçları karşılaştırmalı olarak verilmiştir. K_m değeri enzimatik reaksiyonun hızı hakkında bilgi veren bir parametredir. Yüksek olması reaksiyonun yavaş yürüdüğünü gösterir. Buna göre tepki süresi en kısa olan biyosensör CH-P(M2)-GOx biyosensörüdür.

Tablo 8.2 Çalışmada üretilen biyosensörler ve özellikleri

Biyosensör	LOD (mM)	K _m (mM)	Ömür (gün)	Lineerlik (mM)	Optimum pH	Kola ^a (%)
CH-P(M1)-GOx	0,48	4,83	63 >	1-10	5	101
CH-P(M2)-GOx	0,57	3,58	30 >	1-15	4,5	91
CH-P(M3)-GOx	0,4	7,61	63 >	1-10	5,5	93

^a Spektroskopik yöntem ve biyosensör arasındaki benzerlik

Bu çalışma sonucunda yukarıda sorulan soruların cevapları araştırılmıştır. Bu doğrultuda biyoyumlu bir biyopolimer olan kitosan ile stabil ve seçici glikoz biyosensörleri başarılı bir biçimde iletken polimerler ile kompozitleri yapılmak suretiyle tasarlanmış ve üretilmiştir. Üretilen her bir kompozit immobilizasyon matrisi olarak kullanıldığında biyosensör olarak verdikleri cevaplar ve çalışma koşulları birbirlerinden farklı olmuştur. Bunun sebebi

kullanılan iletken polimerlerdeki amin gruplarının yeri ve elektronların taşınmasını sağlayan polimerin iletkenlik potansiyelidir. Buna bağlı olarak, üç taraflı amin grubuna sahip P(M2) ile hazırlanan biyosensörün K_m değeri diğerlerinden daha düşüktür ve bu durum enzimin amin grupları ile daha iyi bağlar oluşturduğunu böylece reaksiyonun daha hızlı gerçekleştiğini gösterir. Ayrıca elektrokimya çalışmalarında en yüksek akım yoğunluğuna p(M1) ile ulaşılmıştır ve biyosensör olarak da en yüksek cevap bu polimer ile hazırlanan biyosensörden elde edilmiştir. Yalnız iletken polimer ve yalnız kitosan kullanılarak biyosensörler üretilmiştir. Ancak sadece kitosan kullanıldığında biyoelektrotun stabilitesinin düşük olduğu ve kısa sürede bozulduğu gözlenmiştir. Sadece iletken polimer kullanıldığında ise sensörün cevabı düşük olmaktadır. Kullanılan matris malzemesine göre sensörün kullanım ömrü değişmektedir. Tasarlanan biyosensörlerden elde edilen cevapların literatüre göre iyi olduğu söylenebilir. Hazırlanan biyosensör platformlarının her seferinde aynı cevabı vermesi bu biyosensörlerin ticari olarak uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

Biyosensör üretimi disiplinler arası bir konudur. Başarılı bir biyosensör tasarımı biyokimya, fizyoloji, yüzey kimyası, elektrokimya ve malzeme kimyası gibi birçok bilim dallarını temel olarak anlamayı gerektirir. Başarıya ulaşmak uzun yıllar boyunca disiplinler arası bir ekip çalışmasını gerektirir.

Bu çalışma da iki farklı elektrot kullanılarak CH/CP kompozit malzemeleri tasarlanıp üretilmiştir. Hazırlanan bu kompozitlerin elektrokimyasal, elektrokromik ve biyosensör olabilme özellikleri araştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Yüzey morfolojisinin biyosensör özelliklerini etkileyen en önemli faktör olduğu düşüncesi bu çalışmalarla pekiştirilmiştir. ITO yüzeyindeki çalışmalarda hedeflenen kompozite ulaşılmıştır. İnce kitosan filminin üzerindeki iletken polimer elektrokimyasal yolla üretildiğinden yüzeyde monomer kalıntısı bulunmaz ve homojen bir dağılım sağlanır ve bunun sonucunda yüzeye immobilize enzim immobilize edilmesiyle elde edilen biyosensörler ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Gelecekte gerekli etik kurul izni alınarak kandaki glikoz miktarının tayini tasarlanan biyosensörler ile yapılabilir. Ayrıca biyosensör fabrikasyon yöntemleri kullanılarak üretilen biyosensörlerin fabrikasyonu yapılabilir ve ticarileştirilme potansiyeli araştırılabilir. Ayrıca oluşturulan kompozitlerin kalınlığı optimize edilip sensör özellikleri arttırılabilir.

9 KAYNAKLAR

- Ak, M., Ak, M. S., Kurtay, G., Güllü, M., & Toppare, L. (2010). Synthesis and electropolymerization of 1,2-bis(thiophen-3-ylmethoxy)benzene and its electrochromic properties and electrochromic device application. *Solid State Sciences*, 12(7), 1199–1204. <http://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2010.03.013>
- Ak, M., Ak, M. S., & Toppare, L. (2006). Electrochemical properties of a new star-shaped pyrrole monomer and its electrochromic applications. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 207(15), 1351–1358. <http://doi.org/10.1002/macp.200600178>
- Ak, M., Camurlu, P., Yılmaz, F., Cianga, L., Yağcı, Y., & Toppare, L. (2006). Electrochromic properties and electrochromic device application of copolymer of N-(4-(3-thienyl methylene)-oxycarbonylphenyl)maleimide with thiophene. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(5), 4500–4505. <http://doi.org/10.1002/app.24834>
- Ak, M., Durmus, A., & Toppare, L. (2007). Solid state electrochromic device applications of N-(2-(thiophen-3-yl)methylcarbonyloxyethyl) maleimide. *Solid State Sciences*, 9(9), 843–849. <http://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2007.06.016>
- Ak, M., Tanyeli, C., Akhmedov, I. M., & Toppare, L. (2008). Optoelectrochemical properties of the copolymer of 2,5-di(4-methylthiophen-2-yl)-1-(4-nitrophenyl)-1H-pyrrole monomer with 3,4-ethylenedioxythiophene. *Thin Solid Films*, 516(12), 4334–4341. <http://doi.org/10.1016/j.tsf.2008.01.013>
- Argun, A. A., Aubert, P.-H., Thompson, B. C., Schwendeman, I., Gaupp, C. L., Hwang, J., ... Reynolds, J. R. (2004). Multicolored Electrochromism in Polymers: Structures and Devices. *Chemistry of Materials*, 16(23), 4401–4412. <http://doi.org/10.1021/cm049669l>
- Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 29 Suppl 1(August), S49-52. <http://doi.org/citeulike-article-id:3416410>
- Ayrancı, R., Ak, M., Ocal, S., & Karakus, M. (2016). Synthesis of new ferrocenyldithiophosphonate derivatives: Electrochemical, electrochromic, and optical properties. *Designed Monomers and Polymers*, 19(5), 429–436.

<http://doi.org/10.1080/15685551.2016.1169377>

Ayranci, R., Başkaya, G., Güzel, M., Bozkurt, S., Şen, F., & Ak, M. (2017). Carbon Based Nanomaterials for High Performance Optoelectrochemical Systems. *ChemistrySelect*, 2(4), 1548–1555. <http://doi.org/10.1002/slct.201601632>

Ayranci, R., Demirkol, D., Ak, M., & Timur, S. (2015). Ferrocene-Functionalized 4-(2,5-Di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)aniline: A Novel Design in Conducting Polymer-Based Electrochemical Biosensors. *Sensors*, 15(1), 1389–1403.

<http://doi.org/10.3390/s150101389>

Ayranci, R., Soganci, T., Guzel, M., Demirkol, D. O., Ak, M., & Timur, S. (2015). Comparative investigation of spectroelectrochemical and biosensor application of two isomeric thienylpyrrole derivatives. *RSC Adv.*, 5(65), 52543–52549.

<http://doi.org/10.1039/C5RA07247F>

Azak, H., Guler, E., Can, U., Demirkol, D. O., Yildiz, H. B., Talaz, O., & Timur, S. (2013). Synthesis of an amine-functionalized naphthalene-containing conducting polymer as a matrix for biomolecule immobilization. *RSC Advances*, 3(42), 19582.

<http://doi.org/10.1039/c3ra42212g>

Bagotskiĭ, V. S. (Vladimir S. (2006). *Fundamentals of electrochemistry*. Wiley-Interscience. Tarihinde adresinden erişildi

[https://books.google.com.tr/books?hl=en&lr=&id=09QI-](https://books.google.com.tr/books?hl=en&lr=&id=09QI-assq1cC&oi=fnd&pg=PR5&dq=V.+S.+Bagotsky,+Fundamentals+of+Electrochemistry.+John+Wiley+%26+Sons,+(2005).&ots=C-ldKmutDK&sig=BGwzXLDwmC0NhH8D_X5-It4OlCc&redir_esc=y#v=onepage&q=V. S. Bagotsky%2C Fundamentals of Electrochemistry. John Wiley %26 Sons%2C (2005).&f=false)

[assq1cC&oi=fnd&pg=PR5&dq=V.+S.+Bagotsky,+Fundamentals+of+Electrochemistry.+John+Wiley+%26+Sons,+\(2005\).&ots=C-](https://books.google.com.tr/books?hl=en&lr=&id=09QI-assq1cC&oi=fnd&pg=PR5&dq=V.+S.+Bagotsky,+Fundamentals+of+Electrochemistry.+John+Wiley+%26+Sons,+(2005).&ots=C-ldKmutDK&sig=BGwzXLDwmC0NhH8D_X5-It4OlCc&redir_esc=y#v=onepage&q=V. S. Bagotsky%2C Fundamentals of Electrochemistry. John Wiley %26 Sons%2C (2005).&f=false)

[ldKmutDK&sig=BGwzXLDwmC0NhH8D_X5-](https://books.google.com.tr/books?hl=en&lr=&id=09QI-assq1cC&oi=fnd&pg=PR5&dq=V.+S.+Bagotsky,+Fundamentals+of+Electrochemistry.+John+Wiley+%26+Sons,+(2005).&ots=C-ldKmutDK&sig=BGwzXLDwmC0NhH8D_X5-It4OlCc&redir_esc=y#v=onepage&q=V. S. Bagotsky%2C Fundamentals of Electrochemistry. John Wiley %26 Sons%2C (2005).&f=false)

[It4OlCc&redir_esc=y#v=onepage&q=V. S. Bagotsky%2C Fundamentals of Electrochemistry. John Wiley %26 Sons%2C \(2005\).&f=false](https://books.google.com.tr/books?hl=en&lr=&id=09QI-assq1cC&oi=fnd&pg=PR5&dq=V.+S.+Bagotsky,+Fundamentals+of+Electrochemistry.+John+Wiley+%26+Sons,+(2005).&ots=C-ldKmutDK&sig=BGwzXLDwmC0NhH8D_X5-It4OlCc&redir_esc=y#v=onepage&q=V. S. Bagotsky%2C Fundamentals of Electrochemistry. John Wiley %26 Sons%2C (2005).&f=false)

Baran, D., Balan, A., Celebi, S., Meana Esteban, B., Neugebauer, H., Sariciftci, N. S., & Toppare, L. (2010). Processable multipurpose conjugated polymer for electrochromic and photovoltaic applications. *Chemistry of Materials*, 22(9), 2978–2987.

<http://doi.org/10.1021/cm100372t>

Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical methods : fundamentals and applications*. Wiley.

Bartlett, P. N., Booth, S., Caruana, D. J., Kilburn, J. D., & Santamaría, C. (1997).

- Modification of Glucose Oxidase by the Covalent Attachment of a Tetrathiafulvalene Derivative. *Analytical Chemistry*, 69(4), 734–742. <http://doi.org/10.1021/ac960533j>
- Bierer, D. W., & Quebbemann, A. J. (1981). Interference of levodopa and its metabolites with colorimetry of uric acid. *Clinical Chemistry*, 27(5). Tarihinde adresinden erişildi <http://clinchem.aaccjnls.org/content/27/5/756>
- Bockris, J. O., Reddy, A. K. N., & Gamboa-Aldeco, M. E. (2000). *Modern Electrochemistry* (Volume 2). Springer. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.springer.com/gp/book/9780306461668>
- Bonhôte, P., Gogniat, E., Campus, F., Walder, L., & Grätzel, M. (1999). Nanocrystalline electrochromic displays. *Displays*, 20(3), 137–144. [http://doi.org/10.1016/S0141-9382\(99\)00015-3](http://doi.org/10.1016/S0141-9382(99)00015-3)
- Bugg, T. (2004). *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry*. Blackwell Pub.
- Bühm, M. C. (1993). H. G. Kiess (Ed.): Conjugated Conducting Polymers, Vol. 102 aus der Reihe: Springer Series in Solid-State Sciences, Springer Verlag Berlin 1992, ISBN 3-540-53594-2, 310 Seiten, Preis DM 98,00. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 97(9), 1167–1168. <http://doi.org/10.1002/bbpc.19930970924>
- Camurlu, P., Gültekin, C., & Gürbulak, V. (2013). Optoelectronic Properties and Electrochromic Device Application of Novel Pyrazole Based Conducting Polymers. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 50(6), 588–595. <http://doi.org/10.1080/10601325.2013.784546>
- Cash, K. J., & Clark, H. A. (2010). Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes. *Trends in Molecular Medicine*, 16(12), 584–593. <http://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2010.08.002>
- Cass, A. E. G., Davis, G., Francis, G. D., Hill, H. A. O., Aston, W. J., Higgins, I. J., ... Turner, A. P. F. (1984). Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Analytical Chemistry*, 56(4), 667–671. <http://doi.org/10.1021/ac00268a018>
- Chou, L. C. (2011). *DEVELOPMENT OF A GLUCOSE SENSOR USING SCREEN-PRINTING AND ELECTROPHORETIC DEPOSITION*. CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY.

- Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102(1), 29–45. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>
- Clarke, S. F., & Foster, J. R. (2012). A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus. *British Journal of Biomedical Science*, 69(2), 83–93.
- Colina, A., Ruiz, V., & Heras, A. (2014). Spectroelectrochemical study of the electrosynthesis of Pt nanoparticles / poly (3 , 4- (ethylenedioxythiophene) composite. *Electrochimica Acta*, 145, 139–147. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.08.004>
- Cosnier, S. (1999). Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosensors & bioelectronics*, 14(5), 443–56. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451912>
- Çilgi, G. K., Karakuş, M., & Ak, M. (2013). Ferrocenyl dithiophosphonate functionalized inorganic-organic hybrid conductive polymer with green color in neutral state. *Synthetic Metals*, 180, 25–31. <http://doi.org/10.1016/j.synthmet.2013.07.017>
- D'Costa, E. J., Higgins, I. J., & Turner, A. P. (1986). Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. *Biosensors*, 2(2), 71–87. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3454651>
- Dai, M., Sun, L., Chao, L., Tan, Y., Fu, Y., Chen, C., & Xie, Q. (2015). Immobilization of Enzymes by Electrochemical and Chemical Oxidative Polymerization of L-DOPA to Fabricate Amperometric Biosensors and Biofuel Cells. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(20), 10843–10852. <http://doi.org/10.1021/acsami.5b01865>
- David, M., Barsan, M. M., Brett, C. M. A., & Florescu, M. (2018). Improved glucose label-free biosensor with layer-by-layer architecture and conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, 3227–3234. <http://doi.org/10.1016/J.SNB.2017.09.149>
- de León, P. C., Campbell, S. A., Smith, J. R., & Walsh, F. C. (2008). Conducting polymer coatings in electrochemical technology Part 2 – Application areas. *Transactions of the*

- IMF*, 86(1), 34–40. <http://doi.org/10.1179/174591908X264392>
- Degani, Y., & Heller, A. (1987). Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. I. Electron transfer from glucose oxidase to metal electrodes via electron relays, bound covalently to the enzyme. *The Journal of Physical Chemistry*, 91(6), 1285–1289. <http://doi.org/10.1021/j100290a001>
- Demetgül, C., & Serin, S. (2008). Synthesis and characterization of a new vic-dioxime derivative of chitosan and its transition metal complexes. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 506–512. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.09.020>
- Demirkol, D. O., & Timur, S. (2011). Chitosan matrices modified with carbon nanotubes for use in mediated microbial biosensing. *Microchimica Acta*, 173(3–4), 537–542. <http://doi.org/10.1007/s00604-011-0596-1>
- Dervisevic, M., Dervisevic, E., Çevik, E., & Şenel, M. (2017). Novel electrochemical xanthine biosensor based on chitosan–polypyrrole–gold nanoparticles hybrid bio-nanocomposite platform. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 510–519. <http://doi.org/10.1016/J.JFDA.2016.12.005>
- Di Carlo, G., Curulli, A., Toro, R. G., Bianchini, C., De Caro, T., Padeletti, G., ... Ingo, G. M. (2012). Green synthesis of gold-chitosan nanocomposites for caffeic acid sensing. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 28(12), 5471–9. <http://doi.org/10.1021/la204924d>
- Diaz, A. F., Kanazawa, K. K., & Gardini, G. P. (1979). Electrochemical polymerization of pyrrole. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (14), 635–636. <http://doi.org/10.1039/C39790000635>
- Diaz, A. F., Martinez, A., Kanazawa, K. K., & Salmón, M. (1981). Electrochemistry of some substituted pyrroles. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 130(Supplement C), 181–187. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(81\)80385-3](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-0728(81)80385-3)
- Eggins, B. R. (2002). *Chemical sensors and biosensors*. J. Wiley.
- Ekiz, F., Ouzkaya, F., Akin, M., Timur, S., Tanyeli, C., & Toppare, L. (2011). Synthesis and application of poly-SNS-anchored carboxylic acid: A novel functional matrix for biomolecule conjugation. *Journal of Materials Chemistry*, 21(33), 12337–12343. <http://doi.org/10.1039/c1jm12048d>

- Fang, Y., & Hu, D. (1999). Cross-Linking of Chitosan With Glutaraldehyde IN THE PRESENCE OF CITRIC ACID - A NEW GELLING SYSTEM. *Chinese Journal of Polymer Science*.
- Fry, A. J. (1989). *Synthetic organic electrochemistry*. J. Wiley.
- Gao, Z., Deng, H., Shen, W., & Ren, Y. (2013). A label-free biosensor for electrochemical detection of femtomolar microRNAs. *Analytical Chemistry*, 85(3), 1624–1630.
<http://doi.org/10.1021/ac302883c>
- Gardner, J. W. (Julian W. ., Varadan, V. K., & Awadelkarim, O. O. (2001). *Microsensors, MEMS, and smart devices*. J. Wiley.
- Grem, G., Leditzky, G., Ullrich, B., & Leising, G. (1992). Realization of a blue-light-emitting device using poly(p-phenylene). *Advanced Materials*, 4(1), 36–37.
<http://doi.org/10.1002/adma.19920040107>
- Groenendaal, L., Jonas, F., Freitag, D., Pielartzik, H., & Reynolds, J. R. (2000). Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives: past, present, and future. *Adv. Mater.*
Tarihinde adresinden erişildi
<http://www3.interscience.wiley.com/journal/71005633/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>
- Guilbault, G. G., & Lubrano, G. J. (1973). An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Analytica Chimica Acta*, 64(3), 439–455.
[http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)82476-4](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)82476-4)
- Guisseppi-Elie, A., Brahim, S. I., & Narinesingh, D. (2002). A Chemically Synthesized Artificial Pancreas: Release of Insulin from Glucose-Responsive Hydrogels. *Advanced Materials*, 14(10), 743–746. [http://doi.org/10.1002/1521-4095\(20020517\)14:10<743::AID-ADMA743>3.0.CO;2-H](http://doi.org/10.1002/1521-4095(20020517)14:10<743::AID-ADMA743>3.0.CO;2-H)
- Guler, E., Soyleyici, H. C., Demirkol, D. O., Ak, M., & Timur, S. (2014). A novel functional conducting polymer as an immobilization platform. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 40(1129010), 148–56.
<http://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.063>
- Gurunathan, K., Murugan, A. V., Marimuthu, R., Mulik, U. ., & Amalnerkar, D. . (1999a). Electrochemically synthesised conducting polymeric materials for applications towards technology in electronics, optoelectronics and energy storage devices.

- Materials Chemistry and Physics*, 61(3), 173–191. [http://doi.org/10.1016/S0254-0584\(99\)00081-4](http://doi.org/10.1016/S0254-0584(99)00081-4)
- Gurunathan, K., Murugan, A. V., Marimuthu, R., Mulik, U. P., & Amalnerkar, D. P. (1999b). Electrochemically synthesised conducting polymeric materials for applications towards technology in electronics, optoelectronics and energy storage devices. *Materials Chemistry and Physics*, 61(3), 173–191. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0254-0584\(99\)00081-4](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0254-0584(99)00081-4)
- Harper, A. C. (2005). *th*, 2005. Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Hauptmann, P. (1993). *Sensors : principles and applications*. München: C. Hanser. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.worldcat.org/title/sensors-principles-and-applications/oclc/932321946?referer=di&ht=edition>
- Işık, D., Ak, M., & Durucan, C. (2009). Structural, electrochemical and optical comparisons of tungsten oxide coatings derived from tungsten powder-based sols. *Thin Solid Films*, 518(1), 104–111. <http://doi.org/10.1016/j.tsf.2009.06.050>
- Jesionowski, T., Jakub, @bullet, @bullet, Z., & Krajewska, B. (y.y.). Enzyme immobilization by adsorption: a review. <http://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>
- Kahlert, H. (2010). Potentiometry. İçinde *Electroanalytical Methods* (ss. 237–256). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8_12
- Kart, S. Ö., Ebru Tanboğa, a, Soyleyici, H. C., Ak, M., & Kart, H. H. (2014). Theoretical study of the structure-properties relationship in new class of 2,5-di(2-thienyl)pyrrole compounds. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 137C, 1174–1183. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2014.08.143>
- Khan, G. F. (1997). TTF-TCNQ complex based printed biosensor for long-term operation. *Electroanalysis*, 9(4), 325–329. <http://doi.org/10.1002/elan.1140090413>
- Khor, E., & Whey, J. L. H. (1995). Interaction of chitosan with polypyrrole in the formation of hybrid biomaterials. *Carbohydrate Polymers*, 26(3), 183–187. [http://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00004-Q](http://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00004-Q)
- Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. (1983). Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 60(9), 702. <http://doi.org/10.1021/ed060p702>

- Komorsky-Lovrić, Š. (2010a). Electrolytes. İçinde *Electroanalytical Methods* (ss. 309–330). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8_16
- Komorsky-Lovrić, Š. (2010b). Working Electrodes. İçinde *Electroanalytical Methods* (ss. 273–290). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8_14
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2–3), 126–139. <http://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2003.12.013>
- Kuralay, F., Demirci, S., Kiristi, M., Oksuz, L., & Oksuz, A. U. (2014). Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) coated chitosan modified disposable electrodes for DNA and DNA–drug interaction sensing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 825–830. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.021>
- Kurtay, G., Ak, M., Güllü, M., Toppare, L., & Ak, M. S. (2014). Synthesis and electropolymerization of 3,4-substituted quinoxaline functionalized pyrrole monomer and optoelectronic properties of its polymer. *Synthetic Metals*, 194(July 2015), 19–28. <http://doi.org/10.1016/j.synthmet.2014.04.002>
- Kuwana, T. (1983). *Physical Methods in Modern Chemical Analysis V3*. Elsevier Science. Tarihinde adresinden erişildi
<https://books.google.com.tr/books?id=96FspCa2ZMUC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
- Li, J., Hu, H., Li, H., & Yao, C. (2017). Recent developments in electrochemical sensors based on nanomaterials for determining glucose and its byproduct H₂O₂. *Journal of Materials Science*, 52(17), 10455–10469. <http://doi.org/10.1007/s10853-017-1221-4>
- Lipchik, A. M., Killins, R. L., Geahlen, R. L., & Parker, L. L. (2012). A peptide-based biosensor assay to detect intracellular Syk kinase activation and inhibition. *Biochemistry*, 51(38), 7515–7524. <http://doi.org/10.1021/bi300970h>
- Liu, X., Peng, Y., Qu, X., Ai, S., Han, R., & Zhu, X. (2011). Multi-walled carbon nanotube-chitosan/poly(amidoamine)/DNA nanocomposite modified gold electrode for determination of dopamine and uric acid under coexistence of ascorbic acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 654(1–2), 72–78.

<http://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.01.024>

- Lojou, É., & Bianco, P. (2006). Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *Journal of Electroceramics*, 16(1), 79–91. <http://doi.org/10.1007/s10832-006-2365-9>
- Lu, X., Zou, G., & Li, J. (2007). Hemoglobin entrapped within a layered spongy Co₃O₄ based nanocomposite featuring direct electron transfer and peroxidase activity. *Journal of Materials Chemistry*, 17(14), 1427. <http://doi.org/10.1039/b615467k>
- MacDiarmid, A. G., & Epstein, A. J. (1989). Polyanilines: a novel class of conducting polymers. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 88(0), 317–332. <http://doi.org/10.1039/DC9898800317>
- Mao, C., Zhu, A., Wu, Q., Chen, X., Kim, J., & Shen, J. (2008). New biocompatible polypyrrole-based films with good blood compatibility and high electrical conductivity. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 67(1), 41–5. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.07.012>
- Marks, R. (Robert S. . (2007). *Handbook of biosensors and biochips*. John Wiley.
- Matthews, D. R., Holman, R. R., Bown, E., Steemson, J., Watson, A., Hughes, S., & Scott, D. (1987). Pen-sized digital 30-second blood glucose meter. *Lancet (London, England)*, 1(8536), 778–779.
- Mentana, A., Palermo, C., Nardiello, D., Quinto, M., & Centonze, D. (2013). Simultaneous and accurate real-time monitoring of glucose and ethanol in alcoholic drinks, must, and biomass by a dual-amperometric biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 61–68. <http://doi.org/10.1021/jf3031474>
- Metin, A., & Et Al. (2007). Optoelectrochemical properties of poly(5,12-dihydrothieno[3,4-b]quinoxaline-co-2,2'-bithiophene) and its electrochromic device application. *Smart Materials and Structures*, 16(6), 2621. <http://doi.org/10.1088/0964-1726/16/6/066>
- Mortimer, R. J. (1999). Organic electrochromic materials. *Electrochimica Acta*, 44(18), 2971–2981. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(99\)00046-8](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0013-4686(99)00046-8)
- Mortimer, R. J., Dyer, A. L., & Reynolds, J. R. (2006). Electrochromic organic and polymeric materials for display applications. *Displays*, 27(1), 2–18. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.displa.2005.03.003>

- Murray, R. W., Ewing, A. G., & Durst, R. A. (1987). Chemically modified electrodes. Molecular design for electroanalysis. *Analytical Chemistry*, 59(5), 379A–390A.
- Namboothiry, M. A. G., Zimmerman, T., Coldren, F. M., Liu, J., Kim, K., & Carroll, D. L. (2007). Electrochromic properties of conducting polymer metal nanoparticles composites. *Synthetic Metals*, 157(13–15), 580–584.
<http://doi.org/10.1016/j.synthmet.2007.06.006>
- Natta, G. (1958). The present situation and prospects of the italian chemical industry ??? high polymer developments. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 36(3), 114–118. <http://doi.org/10.1002/cjce.5450360305>
- Newman, J. D., & Turner, A. P. F. (2005). Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), 2435–2453.
<http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.11.012>
- Nigrey, P. J., MacDiarmid, A. G., & Heeger, A. J. (1979). Electrochemistry of polyacetylene, (CH): electrochemical doping of (CH) films to the metallic state. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (14), 594–595.
<http://doi.org/10.1039/C39790000594>
- Organic electrochromic materials. (1999). *Electrochimica Acta*, 44(18), 2971–2981.
[http://doi.org/10.1016/S0013-4686\(99\)00046-8](http://doi.org/10.1016/S0013-4686(99)00046-8)
- Ozdemir, C., Tuncagil, S., Demirkol, D. O., Timur, S., & Toppare, L. (2011). Design of Carbon Nanotube Modified Conducting Polymer for Biosensing Applications. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 48(7), 503–508.
<http://doi.org/10.1080/10601325.2011.579804>
- Pron, A., & Rannou, P. (2002). Processible conjugated polymers: from organic semiconductors to organic metals and superconductors. *Progress in Polymer Science*, 27(1), 135–190. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00043-0](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00043-0)
- Raczkowska, J., Cyganik, P., Budkowski, A., Bernasik, A., Rysz, J., Raptis, I., ... Kowalski, K. (2005). Composition Effects in Polymer Blends Spin-Cast on Patterned Substrates. *Macromolecules*, 38(20), 8486–8493. <http://doi.org/10.1021/ma051242s>
- Ramanavičius, A., Ramanavičiene, A., & Malinauskas, A. (2006). Electrochemical sensors based on conducting polymer-polypyrrole. *Electrochimica Acta*, 51(27), 6025–6037.
<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.11.052>

- Randriamahazaka, H., Noël, V., Guillerez, S., & Chevrot, C. (2005). Interpenetrating organic conducting polymer composites based on polyaniline and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) from sequential electropolymerization. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 585(2), 157–166.
<http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2005.05.015>
- Rauf, S., Ihsan, A., Akhtar, K., Ghauri, M. A., Rahman, M., Anwar, M. A., & Khalid, A. M. (2006). Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetate–polymethylmethacrylate membrane. *Journal of Biotechnology*, 121(3), 351–360.
<http://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2005.08.019>
- Ren, Y., Deng, H., Shen, W., & Gao, Z. (2013). A highly sensitive and selective electrochemical biosensor for direct detection of microRNAs in serum. *Analytical Chemistry*, 85(9), 4784–4789. <http://doi.org/10.1021/ac400583e>
- Reza, K. K., Ali, M. A., Srivastava, S., Agrawal, V. V., & Biradar, A. M. (2015). Tyrosinase conjugated reduced graphene oxide based biointerface for bisphenol A sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 644–651.
<http://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.020>
- Rodwell, G. F. (1862). XIII.-On the solubility of sulphate of lead in hydrochloric and nitric acids. *Journal of the Chemical Society*, 15(0), 59–61.
<http://doi.org/10.1039/JS8621500059>
- Saçak, M., Karaki?la, M., & Akbulut, U. (1997). A 316 steel electrode coated with polycarbonate for electropolymerization of aniline. *Journal of Applied Polymer Science*, 65(6), 1103–1111. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970808\)65:6<1103::AID-APP5>3.0.CO;2-O](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970808)65:6<1103::AID-APP5>3.0.CO;2-O)
- Saleem, M., Yu, H., Wang, L., Zain-Ul-Abdin, Khalid, H., Akram, M., ... Huang, J. (2015). Review on synthesis of ferrocene-based redox polymers and derivatives and their application in glucose sensing. *Analytica chimica acta*, 876, 9–25.
<http://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.012>
- Scheller, F. (Frieder), & Schubert, F. (1992). *Biosensors*. Elsevier.
- Scholz, F. (2010). Books on Fundamental Electrochemistry and Electroanalytical Techniques. İçinde *Electroanalytical Methods* (ss. 343–345). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8_19

- Scholz, F. (2014). *Electroanalytical Methods Guide to Experiments and Applications*. Springer Berlin.
- Selçuk, S. (2010). *İletken Zeolit/Polipirol Kompozitinin Hazırlanması, Karakterizasyonu Ve Nem İle Sıcaklığa Karşı Sensör Özelliğinin İncelenmesi*. Ankara Üniversitesi.
- Setford, S. J., & Newman, J. D. (2005). Enzyme Biosensors. İçinde J. L. Barredo (Ed.), *Microbial Enzymes and Biotransformations* (ss. 29–60). Totowa, NJ: Humana Press. <http://doi.org/10.1385/1-59259-846-3:029>
- Sharma, A., & Kumar, A. (2016). Study of structural and electro-catalytic behaviour of amperometric biosensor based on chitosan/polypyrrole nanotubes-gold nanoparticles nanocomposites. *Synthetic Metals*, 220, 551–559. <http://doi.org/10.1016/J.SYNTHMET.2016.07.012>
- Shin, M.-C., & Kim, H.-S. (1996). Electrochemical characterization of polypyrrole/glucose oxidase biosensor: Part I. Influence of enzyme concentration on the growth and properties of the film. *Biosensors and Bioelectronics*, 11(1–2), 161–169. [http://doi.org/10.1016/0956-5663\(96\)83723-7](http://doi.org/10.1016/0956-5663(96)83723-7)
- Shirakawa, H., Louis, E. J., MacDiarmid, A. G., Chiang, C. K., & Heeger, A. J. (1977). Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH) x . *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (16), 578. <http://doi.org/10.1039/c39770000578>
- Shirale, D. J., Gade, V. K., Gaikwad, P. D., Savale, P. A., Kharat, H. J., Kakde, K. P., ... Shirsat, M. D. (2006a). Studies of immobilized glucose oxidase on galvanostatically synthesized poly(N-methylpyrrole) film with PVS-NaNO₃ composite dopant. *International Journal of Electrochemical Science*, 1(2), 62–70.
- Shirale, D. J., Gade, V. K., Gaikwad, P. D., Savale, P. A., Kharat, H. J., Kakde, K. P., ... Shirsat, M. D. (2006b). Studies of immobilized glucose oxidase on galvanostatically synthesized poly (N - methylpyrrole) film with PVS - NaNO₃ composite dopant. *Int . J . Electrochem . Sci*, 1, 62–70. Tarihinde adresinden erişildi [https://www.researchgate.net/profile/Vikas_Gade/publication/26493905_Studies_of_immobilized_glucose_oxidase_on_galvanostatically_synthesized_polyN-methylpyrrole_film_with_PVS-NaNO₃_composite_dopant/links/0deec52f9e75f2e816000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Vikas_Gade/publication/26493905_Studies_of_immobilized_glucose_oxidase_on_galvanostatically_synthesized_polyN-methylpyrrole_film_with_PVS-NaNO3_composite_dopant/links/0deec52f9e75f2e816000000.pdf)

- Shrestha, B. K., Ahmad, R., Mousa, H. M., Kim, I.-G., Kim, J. I., Neupane, M. P., ... Kim, C. S. (2016). High-performance glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase immobilized polypyrrole/Nafion/functionalized multi-walled carbon nanotubes bio-nanohybrid film. *Journal of Colloid and Interface Science*, 482, 39–47.
<http://doi.org/10.1016/J.JCIS.2016.07.067>
- Singh, J., Khanra, P., Kuila, T., Srivastava, M., Das, A. K., Kim, N. H., ... Lee, J. H. (2013). Preparation of sulfonated poly(ether-ether-ketone) functionalized ternary graphene/AuNPs/chitosan nanocomposite for efficient glucose biosensor. *Process Biochemistry*, 48(11), 1724–1735. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.025>
- Skotheim, T. A., Elsenbaumer, E., & Reynolds, J. R. (1999). Handbook of Conducting Polymers, 2nd edition. *IEEE Electrical Insulation Magazine*.
<http://doi.org/10.1109/MEI.1999.744595>
- Soganci, T., Ak, M., Ocal, S., & Karakus, M. (2015). Ferrocenyldithiophosphonate Containing Conducting Polymers and Theirs Electrochromic Application. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 1011–1018.
<http://doi.org/10.1007/s10904-015-0202-9>
- Soganci, T., Kurtay, G., Ak, M., & Güllü, M. (2014). Preparation of an EDOT-based polymer: optoelectronic properties and electrochromic device application. *RSC Adv.*, 5(4), 2630–2639. <http://doi.org/10.1039/C4RA13060J>
- Soganci, T., Soyleyici, H. C., & Ak, M. (2016). A soluble and fluorescent new type thienylpyrrole based conjugated polymer: optical, electrical and electrochemical properties. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18(21), 14401–14407.
<http://doi.org/10.1039/C6CP02214F>
- Soganci, T., Soyleyici, H. C., Ak, M., & Cetisli, H. (2016). An Amide Substituted Dithienylpyrrole Based Copolymer: Its Electrochromic Properties. *Journal of The Electrochemical Society*, 163(2), H59–H66. <http://doi.org/10.1149/2.0631602jes>
- Soganci, T., Soyleyici, S., Soyleyici, H. C., & Ak, M. (2017). Optoelectrochromic characterization and smart windows application of bi-functional amid substituted thienyl pyrrole derivative. *Polymer (United Kingdom)*, 118, 40–48.
<http://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.04.060>
- Soğancı, T. (2017). *Denizli , eylül - 2017. PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ. Tarihinde*

adresinden erişildi <http://hdl.handle.net/11499/2103>

- Somania, P. R., & Radhakrishnan, S. (2002). Electrochromic materials and device: present and future. *Materials Chemistry and Physics*, 77, 117–133.
[http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0254-0584\(01\)00575-2](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0254-0584(01)00575-2)
- Söyleyici, H. C., Ak, M., Şahin, Y., Demikol, D. O., & Timur, S. (2013). New class of 2,5-di(2-thienyl)pyrrole compounds and novel optical properties of its conducting polymer. *Materials Chemistry and Physics*, 142(1), 303–310.
<http://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2013.07.019>
- Stojek, Z. (2010). Experimental Setup. İçinde *Electroanalytical Methods* (ss. 331–335). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8_17
- Tang, W., Li, L., Wu, L., Gong, J., & Zeng, X. (2014). Glucose biosensor based on a glassy carbon electrode modified with polythionine and multiwalled carbon nanotubes. *PloS one*, 9(5), e95030. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0095030>
- Tarkuc, S., Ak, M., Onurhan, E., & Toppare, L. (2008). Electrochromic Properties of “Trimeric” Thiophene-Pyrrole-Thiophene Derivative Grown from Electrodeposited 6-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)hexan-1-Amine and Its Copolymer. *Journal of Macromolecular Science Part A-Pure and Applied Chemistry*, 45(2), 164–171.
<http://doi.org/10.1080/10601320701786976>
- Taylor, R. F., & Schultz, J. S. (Jerome S. (1996). *Handbook of chemical and biological sensors*. Institute of Physics Pub.
- Thambidurai, S., & Pandiselvi, K. (2018). Polyaniline/Natural Polymer Composites and Nanocomposites. İçinde *Polyaniline Blends, Composites, and Nanocomposites* (ss. 235–256). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-809551-5.00009-6>
- Tourillon, G., & Garnier, F. (1982). New electrochemically generated organic conducting polymers. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 135(1), 173–178. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-0728\(82\)90015-8](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-0728(82)90015-8)
- Trung, T., Trung, T. H., & Ha, C.-S. (2005). Preparation and cyclic voltammetry studies on nickel-nanoclusters containing polyaniline composites having layer-by-layer structures. *Electrochimica Acta*, 51(5), 984–990.
<http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.04.074>

- Tuncagil, S., Odaci, D., Yildiz, E., Timur, S., & Toppare, L. (2009). Design of a microbial sensor using conducting polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole-1-yl) benzenamine. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 137(1), 42–47.
<http://doi.org/10.1016/j.snb.2008.10.067>
- Turaç, E., Ak, M., Şahmetlioglu, E., Kasım Şener, M., & Kaya, M. A. (2012). Synthesis and characterization of poly{2-[3-(1H-pyrrol-2-yl)phenyl]-1H-pyrrole} and its copolymer with EDOT. *Russian Journal of General Chemistry*, 81(12), 2510–2516.
<http://doi.org/10.1134/S1070363211120164>
- Urdike, S. J., & Hicks, G. P. (1967). The Enzyme Electrode. *Nature*, 214, 986. Tarihinde adresinden erişildi <http://dx.doi.org/10.1038/214986a0>
- Ustamehmetoğlu, B., Kızılcan, N., & Demir, Ö. (2012). Electrocopolymerization of pyrrole with bis(4-aminobutyl)polydimethylsiloxane. *Pigment & Resin Technology*, 41(3), 179–186. <http://doi.org/10.1108/03699421211226471>
- Uzun, S. D., Unlu, N. A., Sendur, M., Kanik, F. E., Timur, S., & Toppare, L. (2013). A novel promising biomolecule immobilization matrix: Synthesis of functional benzimidazole containing conducting polymer and its biosensor applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 74–80.
<http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.049>
- Vashist, S. K., Zheng, D., Al-Rubeaan, K., Luong, J. H. T., & Sheu, F.-S. (2011). Technology behind commercial devices for blood glucose monitoring in diabetes management: a review. *Analytica Chimica Acta*, 703(2), 124–136.
<http://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.024>
- Ventosa, E., Colina, A., Heras, A., Martínez, A., Orcajo, O., Ruiz, V., & López-Palacios, J. (2008). Electrochemical, spectroscopic and electrogravimetric detection of oligomers occluded in electrochemically synthesized poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films. *Electrochimica Acta*, 53(12), 4219–4227.
<http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.12.064>
- Vork, F. T. A., Schuermans, B. C. A. M., & Barendrecht, E. (1990). Influence of inserted anions on the properties of polypyrrole. *Electrochimica Acta*, 35(2), 567–575.
[http://doi.org/10.1016/0013-4686\(90\)87045-4](http://doi.org/10.1016/0013-4686(90)87045-4)
- Wang, J. (2000). *Analytical Electrochemistry, 2nd Edition (Wang, Joseph)*. New York:

Wiley-VCH.xvi.

- Wang, J. (2005). Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *The Analyst*, 130(4), 421. <http://doi.org/10.1039/b414248a>
- Wang, J. (2008). Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 814–825. <http://doi.org/10.1021/cr068123a>
- Wang, J., Cao, Y., & Lu, Y. (2015). Size-controllable polypyrrole nanospheres synthesized in the presence of phosphorylated chitosan and their size effect in different applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(5), 1–9. <http://doi.org/10.1007/s11051-015-3046-x>
- Wang, J., Tian, B., Nascimento, V. B., & Angnes, L. (1998). Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electrochimica Acta*, 43(23), 3459–3465. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(98\)00092-9](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0013-4686(98)00092-9)
- Wang, J. Y., Chen, L. C., & Ho, K. C. (2013). Synthesis of redox polymer nanobeads and nanocomposites for glucose biosensors. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(16), 7852–7861. <http://doi.org/10.1021/am4018219>
- Wiley, C. J. (2002). Introduction to Electrochromism. *Polymer*, (1).
- Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H. J., & Kalisz, H. M. (2000). Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of beta-D-glucose. *The Biochemical journal*, 347(Pt 2), 553–9. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749686>
- Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H. M., & Hecht, H. J. (1999). 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 55(Pt 5), 969–77. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10216293>
- Wong, S. (1991). *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*. Tarihinde adresinden erişildi https://www.google.com/books?hl=en&lr=&id=XelpGMQmj1UC&oi=fnd&pg=PA7&dq=Wong,+S.S.,+Chemistry+of+protein+conjugation+and+cross-linking,+CRC+Press,+Boca+Raton,+Florida,+1991&ots=_7hdIKMKty&sig=Kmp_ztWpe4HuwEqPA7P0DVJ0vjY

- Wu, T., Pan, Y., Bao, H., & Li, L. (2011). Preparation and properties of chitosan nanocomposite films reinforced by poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate) treated carbon nanotubes. *Materials Chemistry and Physics*, 129(3), 932–938. <http://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.05.030>
- Yağmur, İ., Ak, M., & Bayrakçeken, A. (2013). Fabricating multicolored electrochromic devices using conducting copolymers. *Smart Materials and Structures*, 22(11), 115022. <http://doi.org/10.1088/0964-1726/22/11/115022>
- Yavuz, A. G., Uygun, A., & Bhethanabotla, V. R. (2010). Preparation of substituted polyaniline/chitosan composites by in situ electropolymerization and their application to glucose sensing. *Carbohydrate Polymers*, 81, 712–719. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.045>
- Ye, D., Luo, L., Ding, Y., Chen, Q., & Liu, X. (2011). A novel nitrite sensor based on graphene/polypyrrole/chitosan nanocomposite modified glassy carbon electrode. *The Analyst*, 136(21), 4563. <http://doi.org/10.1039/c1an15486a>
- Zhang, Y., Liu, Y., Chu, Z., Shi, L., & Jin, W. (2013). Amperometric glucose biosensor based on direct assembly of Prussian blue film with ionic liquid-chitosan matrix assisted enzyme immobilization. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 176, 978–984. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2012.09.080>
- Zhao, Y., Cao, L., Li, L., Cheng, W., Xu, L., Ping, X., ... Shi, Y. (2016). Conducting polymers and their applications in diabetes management. *Sensors (Switzerland)*, 16(11), 1–14. <http://doi.org/10.3390/s16111787>
- Zor, E., Oztekin, Y., Ramanaviciene, a., Anusevicius, Z., Bingol, H., Barkauskas, J., ... Ramanavicius, a. (2014). Amperometric Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase, 1,10-Phenanthroline-5,6-dione and Carbon Nanotubes. *Journal of the Electrochemical Society*, 161(13), H3064–H3069. <http://doi.org/10.1149/2.0061413jes>

10 ÖZGEÇMİŞ

Betül ÇİÇEK ÖZKAN

Tel: 0 (424) 2370000 (4249)
0 (543) 9372162

Adres: Fırat Üniversitesi Teknoloji Fakültesi
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü

Doğum Tarihi : 02.08.1981
Doğum Yeri : Palu
Uyruğu : T.C.
Medeni Hali : Evli

Eğitim Durumu :

2013 - 2017 **Fırat Üniversitesi (Elazığ)**
Metalurji ve Malzeme Müh. Malzeme Prog. Doktora Eğitimi
2009 - 2011 **Friedrich Alexander Universität Erlangen - Nürnberg**
LSP - Institute of Polymer Materials -Yüksek Lisans Eğitimi
2008 – 2009 **Friedrich Alexander Universität Erlangen - Nürnberg**
Yüksek Lisans öncesi Bilimsel Hazırlık
2007 – 2008 **Carl Duisberg Centrum - Berlin**
Yüksek Lisans öncesi Almanca Dil Eğitimi
2002 – 2006 **Fırat Üniversitesi (Elazığ)**
Kimya Mühendisliği Lisans Eğitimi
1992 – 1999 **Elazığ İmam Hatip Lisesi (Elazığ)**
Ortaöğrenim
1987 – 1992 **Ziya Gökalp İlköğretim Okulu (Elazığ)**
İlköğretim

Yabancı Diller :

Almanca
(İyi Seviyede)
İngilizce
(İyi Seviyede)

Deneyimler :

2011 - **Fırat Üniversitesi Teknoloji Fakültesi**
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü
Araştırma Görevlisi