

Sarkozin Tayini İçin Potansiyometrik Sensör Geliştirilmesi

Nazire Altunkök

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Kimya Anabilim Dalı

Ocak 2019

Development Of Potentiometric Sensors For The Determination Of Sarcosine

Nazire Altunkök

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

January 2019

Sarkozin Tayini İçin Potansiyometrik Sensör Geliştirilmesi

Nazire Altunkök

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmelięi Uyarınca  
Kimya Anabilim Dalı  
Analitik Kimya Bilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük

Bu tez ESOGÜ BAP komisyonu tarafından “ 2018-2054 ” no’lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

Ocak 2019

## ONAY

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Nazire Altunkök'ün YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Sarkozin Tayini İçin Potansiyometrik Sensör Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Danışman :** Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük

**İkinci Danışman :** —

**Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:**

**Üye :** Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük

**Üye :** Doç. Dr. Tufan Güray

**Üye :** Dr. Öğr. Üyesi Özlem Biçen Ünlüer

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve  
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN  
Enstitü Müdürü

## ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük danışmanlığında hazırlamış olduğum “Sarkozin Tayini İçin Potansiyometrik Sensör Geliştirilmesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 25/01/2019

Nazire Altunkök

İmza

## ÖZET

Sarkozin; serin, kreatin, purin veya glutasyon kaynağı olarak yaşayan hücrelerin metabolik süreçlerinde, kaslarda ve diğer vücut dokularında bulunan doğal bir amino asittir. N-metilglisin olarak da bilinen sarkozin, glisin sentezi ve bozunmasında ara ürün ve yan üründür.

Prostat kanseri, kansere bağlı ölümler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Sarkozin konsantrasyonunun kan serumu ve idrarda artış göstermesi, prostat kanserinin yayılması sırasında büyük oranda artmakta ve idrarda tespit edilebilen farklı bir metabolit olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle, prostat kanseri erken dönemde tespiti için biyolojik örneklerde sarkozinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu amaçla, sarkozin tayin edilebilmesi için yüksek hassasiyeti olan, hazırlanması ve prosedürü basit, az maliyeti olan, düşük derişimlere inebilen bir yöntemin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Sarkozin molekülü için yüksek hassasiyete sahip nano-anti-C reaktif protein antibadi (CRP) ve anti-CRP antibadi konjuge grafen oksit (GFOX) polimerleri hazırlanarak, bu polimerlerin potansiyometrik sensör olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. İlk olarak; ANADOLUCA yöntemine dayanan bis(2-2-bipiridil)-bis(metakriolil tirozin)rutenyum (II) sentezlenmiştir. İkinci aşamada; nano-anti-CRP antibadi için, bis(2-2-bipiridil)-bis(metakriolil tirozin)rutenyum (II) ile anti-CRP antibadi varlığında çapraz bağlanıp; nano-anti-CRP antibadi hazırlanmıştır. Üçüncü aşamada; NHS/EDC çapraz bağlama yaklaşımına göre grafen oksit hazırlanmıştır. Reaksiyon ortamına bis(2-2-bipiridil)-bis(metakriolil tirozin)rutenyum (II) eklenip; reaksiyondan sonra, ortama anti-CRP antibadi ilave edilmiştir ve anti-CRP-antibadi-GFOX hazırlanmıştır. Son aşamada ise; hazırlanan nano-anti-CRP antibadi katkılı ve anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı iki farklı potansiyometrik sensör elde edilmiştir. Hazırlanmış olan potansiyometrik sensörlerin potansiyel yanıtı, pH etkisi, cevap zamanı, seçicilik ve tekrar kullanılabilirlik performansları incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sarkozin, potansiyometrik sensör, grafen oksit

## SUMMARY

Sarcosine; is a natural amino acid found as a source of serine, creatine, purine or glutathione metabolic processes of living cells in muscle and other body tissues. Sarcosine, also known as N-methyl glycine, intermediate and side product in the synthesis and degradation of glycine.

Prostate cancer ranks first among cancer-related deaths. The increased concentration of sarcosine in blood serum and urine is greatly increased during the spread of prostate cancer and is defined as a different metabolite that can be detected in urine. Therefore, the determination of sarcosine in biological samples to detect prostate cancer early is very important.

For this purpose, it is aimed to develop a method which has high sensitivity for the determination of sarcosine, easy to prepare and procedure, low cost and very low concentrations. High sensitivity nano-anti-C reactive protein antibody (CRP) and anti-CRP antibody conjugated graphene oxide (GFOX) polymers were prepared for the sarcosine molecule and the usability of these polymers as potentiometric sensors was investigated. Firstly; bis(2-2-bipyridil)-bis(metakriolil tirosin)rutenyum (II) based on the ANADOLUCA method was synthesized. In the second stage; for the nano-anti-CRP antibody, cross-linking in the presence of anti-CRP antibody with bis(2-2-bipyridil)-bis(metakriolil tirosin)rutenyum (II) ; nano-anti-CRP antibody was prepared. In the third stage; graphene oxide was prepared according to the NHS / EDC cross-linking approach. bis(2-2-bipyridil)-bis(metakriolil tirosin)rutenyum (II) was added to the reaction medium; after the reaction, anti-CRP antibody was added to the medium and anti-CRP- antibody-GFOX was prepared. Finally; two different potentiometric sensors were obtained with prepared nano-anti-CRP antibody and anti-CRP- antibody-GFOX. Potential response of potentiometric sensors, pH effect, response time, selectivity and re-usability performances were observed.

**Keywords:** Sarcosine, potentiometric sensor, graphene oxide

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarında bilgisi, tecrübesiyle beni her zaman yönlendiren ve ban her türlü olanağı sağlayan, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi, değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük' e çok teşekkür ederim.

Bu çalışma BAP “Prostat Kanserinin Teşhisi İçin Potansiyometrik Biosensör Geliştirilmesi” isimli 2018-2054 no’lu proje tarafından desteklenmiştir. BAP’ a katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında katkılarından dolayı Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Özlem Biçen Ünlüer’ e teşekkür ederim.

Çalışmalarında katkılarından dolayı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi, Prof. Dr. Evrim Hür ve öğretim görevlisi, Esmâ Ocak’ a teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm Teknisyeni Dilek Dalyancı’ ya teşekkür ederim.

Çalışmalarında katkılarından dolayı Burcu Yazıcı’ya ve Nazan Kökçü’ye teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve eğitim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen sevgili aileme çok teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	vi
<b>SUMMARY</b> .....	vii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	viii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xv
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI</b> .....	3
2.1. Aminoasitler .....	3
2.1.1. Aminoasitlerin genel yapıları .....	3
2.2. Aminoasitlerin Genel Sınıflandırılmaları .....	4
2.2.1. Aminoasitlerin R gruplarına göre sınıflandırılması .....	4
2.2.2. Aminoasitlerin biyolojik özelliklerine göre sınıflandırılması.....	7
2.2.2.1. <u>Protein yapısına giren amino asitler</u> .....	7
2.2.2.2. <u>Protein yapısına girmeyen amino asitler</u> .....	8
2.3. Sarkozin Hakkında Genel Bilgi .....	9
2.3.1. Sarkozinin insan sağlığına etkisi .....	11
2.4. Sarkozin İle İlgili Çalışmalar .....	11
2.5. Antikorlar .....	14
2.6. Nanopartikül .....	17
2.7. Sensörler .....	20
2.7.1. Kimyasal sensörler .....	21
2.7.2. Kimyasal sensörlerin sınıflandırılması .....	21
2.7.2.1. <u>Elektrokimyasal sensörler</u> .....	22
2.7.2.2. <u>Potansiyometrik sensörler</u> .....	23
2.7.3. Elektrot çeşitleri .....	25
2.7.3.1. <u>Referans elektrotlar</u> .....	25

## İÇİNDEKİLER (devam)

### Sayfa

2.7.3.2. İndikatör elektrotlar .....	29
2.7.3.3. İyon seçici elektrotların avantaj ve dezavantajları .....	30
2.7.3.4. İyon seçici elektrotların performans özellikleri .....	31
2.7.3.5. Seçicilik katsayısını belirlemede kullanılan yöntemler .....	35
2.8. Potansiyometrik Sensör İle İlgili Çalışmalar .....	37
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>41</b>
3.1. Materyal .....	41
3.1.1. Kullanılan kimyasallar .....	41
3.1.2. Kullanılan cihazlar .....	41
3.2. Yöntem .....	42
3.2.1. Fotosentitif biyokonjugasyon yapabilecek aminoasit monomer sentezi .....	42
3.2.1.1. <u>Diklorobis(2-2'-bipiridil) rutenyum (RuCl<sub>2</sub>(bipyr)<sub>2</sub>) sentezi</u> .....	43
3.2.1.2. <u>Klorobis(2-2'-bipiridil) MATyr-rutenyum (RuClMATyr(bipyr)<sub>2</sub>) sentezi</u> .....	42
3.2.1.3. <u>Bis(2-2'-bipiridil)-bisMATyr-rutenyum (RuMATyr(MATyr(bipyr)<sub>2</sub>) sentezi</u> .....	43
3.2.2. Nano-anti C reaktif protein antibadinin sentezi .....	43
3.2.3. Anti-C reaktif protein antibadi konjuge grafen oksitin sentezi .....	44
3.2.4. Hazırlanan malzemelerin potansiyometrik sensör yapımında kullanımı .....	44
3.2.4.1. <u>Polimerli karbon pasta elektrodun hazırlanması</u> .....	44
3.2.4.2. <u>Kontrol karbon pasta elektrodun hazırlanması</u> .....	45
3.2.4.3. <u>Potansiyel ölçüm sistemi</u> .....	46
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>47</b>
4.1. Karakterizasyon .....	47
4.1.1. <u>Diklorobis(2-2'-bipiridil) rutenyum karakterizasyonu</u> .....	47
4.1.2. <u>Klorobis(2-2'-bipiridil) MATyr-rutenyum karakterizasyonu</u> .....	48
4.1.3. <u>Bis(2-2'-bipiridil)-bis(MATyr)rutenyum (II) karakterizasyonu</u> .....	49
4.1.4. Nano-anti C reaktif protein antibadinin karakterizasyonu .....	51

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
4.1.5. Anti-C reaktif protein antibadi konjuge grafen oksit karakterizasyonu.....	54
4.2. Potansiyometrik Sensör İle Yapılan Ölçümler .....	57
4.2.1. Potansiyometrik sensör için şartlandırma yapılması .....	57
4.2.2. pH etkisi .....	58
4.2.3. Derişimin etkisi .....	58
4.2.4. Cevap süresinin belirlenmesi .....	60
4.2.5. Tekrar kullanılabilirlik ve ömrünün belirlenmesi .....	61
4.2.6. Analitik performansının değerlendirilmesi .....	62
4.2.7. Seçicilik çalışması .....	64
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>69</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Aminoasidin genel yapısı .....	4
2.2. Sarkozin molekülünün yapısı .....	9
2.3. Sarkozin-glisin reaksiyonu .....	10
2.4. Antikorların genel yapısı .....	15
2.5. Grafen yapısı .....	19
2.6. Grafen oksit yapısı .....	20
2.7. Bir sensörün çalışma düzeneği .....	21
2.8. Basit bir potansiyometrik sistem .....	24
2.9. Referans hidrojen elektrot .....	26
2.10. Kalomel referans elektrot .....	27
2.11. Gümüş/gümüş klorür referans elektrot .....	28
2.12. Doğrusal çalışma aralığı .....	32
2.13. İyon seçici elektrotların tayin sınırlarının belirlenmesini gösteren grafik .....	33
2.14. IUPAC' a göre cevap süresi .....	34
3.1. Polimerli karbon pasta elektrot elektrot .....	45
3.2. Kontrol karbon pasta elektrot .....	46
3.3. Potansiyel ölçüm sistemi .....	46
4.1. MALDI-TOF/MS Ru(bipy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> spektrumu .....	48
4.2. Klorobis(2-2'-bipiridil) MATyr-rutenyum .....	49
4.3. Bis(2-2'-bipiridil)-bis(MATyr)-rutenyum (II) .....	50
4.4. Nano-anti CRP antibadi floresans spektrumu .....	51
4.5. Nano-anti CRP antibadinin SEM görüntüleri .....	52
4.6. Nano-anti CRP antibadi zeta boyut spektrumu .....	53
4.7. Nano-anti CRP antibadi CD spektrumu .....	54
4.8. Anti-CRP-antibadi-GFOX floresans spektrumu .....	55
4.9. Anti-CRP-antibadi-GFOX SEM görüntüleri .....	55
4.10. Anti-CRP-antibadi-GFOX zeta boyut spektrumu .....	56
4.11. Anti-CRP-antibadi-GFOX CD spektrumu .....	57

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.12. Potansiyometrik sensöre pH etkisi .....	58
4.13. Potansiyometrik sensörlere sarkozin konsantrasyonunun etkisi .....	59
4.14. Potansiyometrik sensörlerin cevap zamanı .....	60
4.15. Potansiyometrik sensörlerin tekrar kullanılabilirliği .....	61
4.16. Nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensörün doğrusal çalışma aralığı .	62
4.17. Anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensörün doğrusal çalışma aralığı .....	63

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Modifiye aminoasitler .....	8
2.2. Protein yapısına girmeyen aminoasitler .....	9
4.1. Potansiyometrik sensörlerin tayin limitinin literatür ile karşılaştırılması .....	63
4.2. Potansiyometrik sensörlerin seçicilik çalışması .....	65

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
%	Yüzde
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
C	Celsius
C	Sarkozin derişimi
cm	Santimetre
dk	Dakika
E	Hücre potansiyeli
E.N.	Erime noktası
$E^\circ$	Standart hücre potansiyeli
F	Fahrenheit
Log	Logaritma
M	Molarite
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mV	Milivolt
nM	Nanomolar
°	Derece
ppm	Milyonda kısım
sn	Saniye
T	Sıcaklık
V	Potansiyel (volt)
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta

**Kisaltmalar**

<b><u>Kisaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
$^1\text{H-NMR}$	Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
$a_A$	Ana iyon aktivitesi

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
$a_B$	Girişim yapan iyon aktivitesi
$Ag^+$	Gümüş
Ag-Ab	Antijen-antikor
AgCl	Gümüş klorür
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AT	Ateanol
Au	Altın
$C_2H_5NO_2$	Glisin
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
CD	Dairesel Dikroizm Spektroskopisi
Cd	Kadmiyum
$CDCl_3$	Kloroform-D
$CH_3COOH$	Asetik asit
CHCA	$\alpha$ -siyano-4-hidroksisinamik asit
$Cl^-$	Klor
COOH	Karboksil
CRP	C Reaktif Protein
Cu	Bakır
DBF	Dibütil fitalat
DMIP	Yapay moleküler baskılanmış polimer
DMSO	Dimetil sülfoksit
DOPA	Dihidroksifenilalanin
DRM	Dijital rektal muayene
$E_A$	Ana iyon çözeltisinin potansiyeli
Fab	Antijen bağlama kısmı
Fc	Kristalize olabilen parça
FRET	Förster rezonans enerji transferi
GABA	$\gamma$ -amino bütirik asit



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
GC	Gaz kromatografisi
Gly	Glisin
GNMT	N-metil transferaz
GO veya GFOX	Grafen oksit
H	Hidrojen
Hg <sup>+</sup>	Civa
Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Civa klorür
His	Histidin
HNO <sub>3</sub>	Nitrik asit
Ig	İmmünglobulin
Ile	İzolösin
Ir	İridyum
ISE	İyon seçici elektrot
k	Seçicilik katsayısı
KCl	Potasyum klorür
LC	Sıvı kromatografisi
Leu	Lösin
LOD	Tespit limiti
LOQ	Tayin limiti
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
MALDI-TOF/MS	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
MATyr-Ru(bipyridil) <sub>2</sub> -MATyr	Bis(2-2'-bipiridil)-metakrilil tirozin - metakrilil tirozin rutenyum (II)
MetOH	Metanol
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum sülfat
MS	Kütle Spektrometresi
NaOH	Sodyum hidroksit
N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Trietilenamin

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
NH <sub>2</sub>	Amin
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
Pb	Kurşun
PCA	Prostat kanseri
Pd	Palladyum
PIPOX	L-pipiklik asit oksidaz
Pro	Prolin
PSA	Prostat spesifik antijen
Pt	Platin
PVA	Polivinil alkol
PVC	Polivinil klorür
RfS	Reflektometrik girişim spektroskopisi
Ru(bipy <sub>2</sub> )-MATyr	Rutenyum tabanlı monomer
RuCl <sub>2</sub> (bipy <sub>2</sub> )	Diklorobis-(2-2'-bipiridil)
RuClMAT(bipy <sub>2</sub> )	Klorobis-(2-2'-bipiridil)-MAT-Rutenyum
RuMAT(MuABt)(bipy <sub>2</sub> )	Bis(2-2'-bipiridil)-MAT-MuABt-Rutenyum
SAH	S-adenosil homosistein
SAM	S-adenosil metoksinin
SARDH	Sarkozin dehidrogenaz
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Ser	Serin
SHE	Standart referans hidrojen elektrot
SPME	Katı faz mikro ekstraksiyon
T4	Tetraiyodotironin
TFA	Trifloroasetik asit
Trp	Triptofan
TRUS	Transrektal ultasonografi
USP	Ultrasonik sprej piroliz yöntemi
UV-Vis	Ultraviyole- görünür ışık

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)****Kısaltmalar**

Val

vd.,

WHO

 $Z_i$ **Açıklama**

Valin

Ve diğerleri

Dünya Sağlık Örgütü

Analit iyonun yükü

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde prostat kanseri, kansere bağlı ölümler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Genellikle, uzun bir süre belirti vermeden ilerlemesinden dolayı prostat kanserinin erken dönemde tespiti önemlidir. Günümüzde prostat kanserini erken dönemde teşhis edebilmek için dijital rektal muayene (DRM), serum prostat spesifik antijen (PSA) düzeyi ve transrektal ultrasonografi (TRUS) ve prostat biyopsisi kullanılan temel araçlardır. Ancak özgüllükleri düşük olduğu için prostat kanseri teşhisinde özgüllüğü daha yüksek belirteç arayışları devam etmektedir. Son zamanlarda doğal, çok bulunan amino asit sarkozin, yeni kabul edilen prostat kanseri markırı olarak kaydedilmiştir. (Cernei vd., 2012).

Sarkozin, kaslarda ve diğer vücut dokularında doğal olarak bulunan bir amino asit türevidir. Biyolojik örneklerde (idrara ve kan plazması) sarkozin konsantrasyonu 1 ila 20 µM arasında değişebilmektedir. Sarkozin konsantrasyonunun kan serumu ve idrarda artış göstermesi sarkozinin prostat kanseri hücrelerini aktive ettiği ve idrarla ölçülen prostat kanseri hücrelerinin malignitesini gösterdiği bildirilmektedir. Sarkozin, prostat kanserinin yayılması sırasında büyük oranda artmakta ve idrarda tespit edilebilen farklı bir metabolit olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle, prostat kanseri erken dönemde tespiti için biyolojik örneklerde sarkozinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Sarkozinin tayini için çeşitli yöntemler kullanılmıştır.

İdrarda sarkozini tayin edebilmek için analitik yöntemler;

- İyon değişim sıvı kromatografisi yöntemi ( Cernei vd. 2012)
- Supramoleküler yaklaşım yöntemi ( Biavardi vd., 2012)
- Florometrik yöntem ( Burton vd., 2012)
- Elektrokimyasal enzimatik biyosensör ( Rebelo vd., 2014)
- LC / GC-MS kullanarak bir metabolik prospektif yöntem
- Refraktometrik girişim spektroskopisi(RIFS) nanosensör ( Diltemiz ve Uslu, 2015)
- Biyomimetik sensör ( Nguy vd., 2017)
- Moleküler baskılı polimere dayanan potansiyometrik sensör ( Özkütük vd., 2016)

Elektroanalitik yöntem dışındaki diğer teknikler; rutin analiz için uygun olmayan yüksek alet ve malzeme maliyetleri, karmaşık numune hazırlama ve vasıflı operatör gereksinimi, etkinlik ve manipülasyon açısından pratik sınırlamaları olduğu bulunmaktadır. Bu nedenle, sarkozin tayini için yüksek hassasiyete sahip, hazırlanması ve prosedürü kolay, basit alet kullanımına sahip, düşük maliyetli, çok düşük derişimlere inebilen bir yöntemin uygulanması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, nano-anti-CRP antibadi ve anti-CRP-antibadi-GFOX ile hazırlanan sensörlerin potansiyometrik davranışları incelenmiştir. İlk olarak; ANADOLUCA konsept yöntemine dayanan patentlenmiş rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerden yola çıkılarak MATyr-Ru(bipyr)<sub>2</sub>-MATyr sentezlenmiştir. İkinci aşamada; nano-anti-CRP antibadi için, MATyr-Ru(bipyr)<sub>2</sub>-MATyr ile çapraz bağlanmış anti-CRP antibadi mikroemülsiyon polimerizasyon ortamına eklenmiştir ve reaksiyon ortamına amonyum persülfat eklenip; azot atmosferi altında nano-anti-CRP antibadi hazırlanmıştır. Üçüncü aşamada; NHS/EDC çapraz bağlama yaklaşımına göre grafen oksit hazırlanmıştır. Reaksiyon ortamına MATyr-Ru (bipyr)<sub>2</sub>-MATyr eklenip; reaksiyondan sonra, ortama anti-CRP antibadi ilave edilmiştir ve anti-CRP-antibadi-GFOX hazırlanmıştır. Son aşamada ise; hazırlanan nano-anti-CRP antibadi katkılı ve anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı iki farklı potansiyometrik sensör elde edilmiştir. Hazırlanmış olan potansiyometrik sensörlerin potansiyel yanıtı, pH etkisi, cevap zamanı, seçicilik ve tekrar kullanılabilirlik performansları gözlenmiştir.

## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

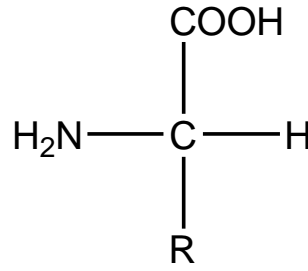
### 2.1. Aminoasitler

Proteinler tüm canlı varlıkların hücrelerinde en fazla bulunan önemli organik bileşiklerdir. Proteinler, kimyasal açıdan yüksek moleküler ağırlıklı azotlu bileşikler olup, temel yapıtaşları olan amino asitlerin kovalent peptid bağlarla birbirine bağlanmasından oluşan polipeptid zincir veya zincirlerin uzayda üç boyutlu yapı oluşturması ile şekillenen biyomoleküllerdir. Her bir amino asidin diğeriyle bağlanırken su kaybetmesiyle oluşan amino asit kalıntısı yanındakine özel bir kovalent bağla bağlanmaktadır ( Nelson ve Cox, 2005).  $\alpha$ -amino asitlerde  $-NH_2$  grubu amino asidin  $\alpha$ -karbon atomuna bağlanmaktadır.  $-COOH$  grubundan sonra gelen ilk karbon atomuna  $\alpha$ -karbon atomu denir. En kısa zincire sahip glisin amino asidi (amino asitlerin genel formülünde (R) harfiyle gösterilen grup da H atomu olduğundan) haricindeki diğeri tüm amino asitlerde  $\alpha$ - karbon atomu asimetric karbon atomu mevcuttur. ( Bingöl, 1972).

Proteinlerle ilgili ilk çalışmalar doğal olarak proteinlerin yapıtaşları olan serbest amino asitler üzerine yapılmıştır ( Nelson ve Cox, 2005). Amino asitler; suda ve polar çözücülerde kolay çözünen, yüksek erime noktasına sahip ( $\sim 300$  °C), beyaz ve katı maddelerdir. Bazıları tatsız (Leu), bazıları tatlı (Gly, Ala, Val, Pro, Ser, Trp ve His ) ve bir kısmı ise acıdır (Ile, Arg).

#### 2.1.1. Amino asitlerin genel yapıları

Amino asitler,  $\alpha$ - karbon atomuna bir amino grubu ( $-NH_2$ ), bir karboksil grubu ( $-COOH$ ), bir proton atomu ( $-H$ ) ve bir yan grubun ( $-R$ ) bağlanması ile oluşan bileşiklerdir. Buradaki R yan grubu,  $\alpha$ - karbonuna bağlı birbirlerinden farklı bir dördüncü yapıyı ifade etmektedir. Amino asitlerin genel görünümü Şekil 2.1.'deki gibidir. Bu yapı amino asidin iyonlaşmamış halidir.



Şekil 2.1. Aminoasidin genel yapısı

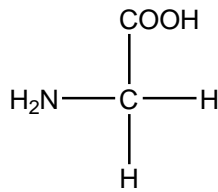
R grubunun (-H dışındaki durumlarında)  $\alpha$ -karbon atomu asimetric olduğundan, amino asitler optikçe aktif olmaktadır. Amino asitler, birbirinin ayna görüntüsü olup D- ve L- izomerleri ismi verilen iki farklı şekli vardır. Ancak sadece L- izomerine sahip olan aminoasitler proteinlerin yapısında yer almaktadır ( Öztoprak, 2017).

## 2.2. Amino Asitlerin Genel Sınıflandırılmaları

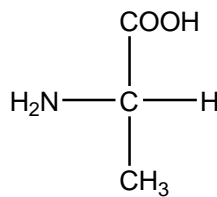
Doğada 300 civarında amino asit bulunmaktadır. Bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi çeşitli canlı türlerindeki proteinlerin yapıtaşları  $\alpha$ -amino asitlerdir ( Hakan, 2013). Tabiatta her ne kadar 300 civarında farklı amino asit çeşidi tanımlanmışsa da, bu amino asitlerden sadece 20 tanesi genetik kodun deşifre edilmesi ile protein sentezine girmektedir ve bu amino asitlere standart amino asitlerde denir ( İbiş, 2018). Fakat, bazı standart amino asitler protein sentezinden sonra modifiye olabilmektedir. Canlılarda bulunup da proteinlerin yapısında bulunmayan başka amino asitlerde vardır. Amino asitler, R gruplarına ve biyolojik özelliklerine göre iki grupta incelenmektedir ( Tekeli, 2014).

### 2.2.1. Amino asitlerin R gruplarına göre sınıflandırılması

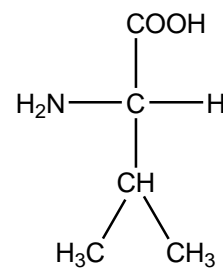
- Alifatik zincire sahip amino asitler: Glisin, alanin, valin, lösin, izölösin, prolin.



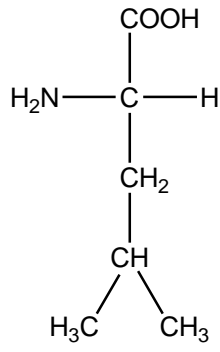
Glisin



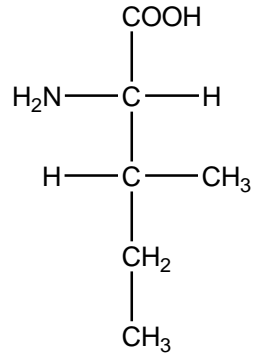
Alanin



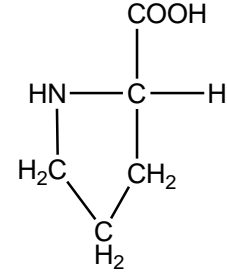
Valin



Lösin

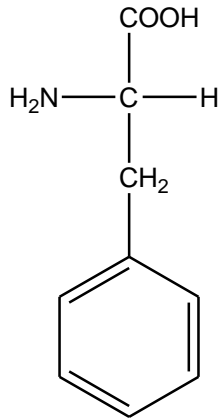


Izolösin

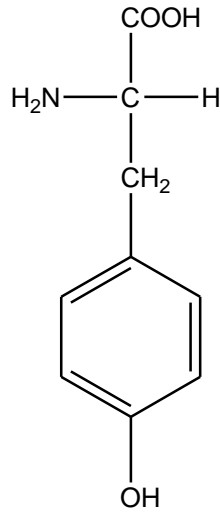


Prolin

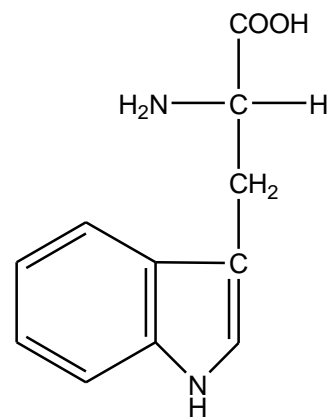
➤ Aromatik zincire sahip aminoasitler: Fenilalanin, tirozin, triptofan.



Fenilalanin

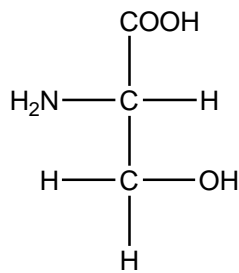


Tirozin

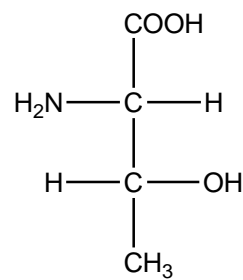


Triptofan

➤ Yan zincirinde hidroksil grubuna sahip amino asitler: Serin, treonin.



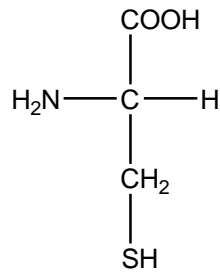
Serin



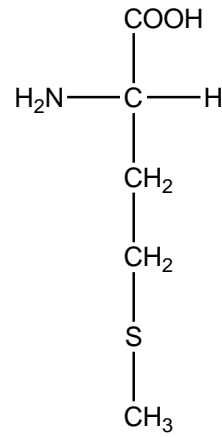
Treonin



- Yan zincirinde tiyol grubuna sahip amino asitler: Sistein, metiyonin.

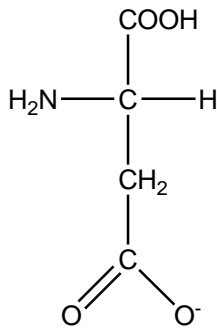


Sistein

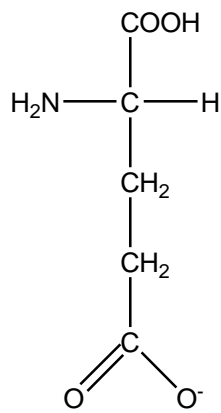


Metiyonin

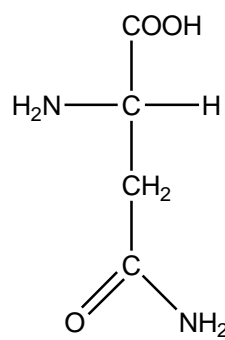
- Asidik yan zincire sahip amino asitler ve amidleri: Aspartat, glutamat, asparagin glutamin.



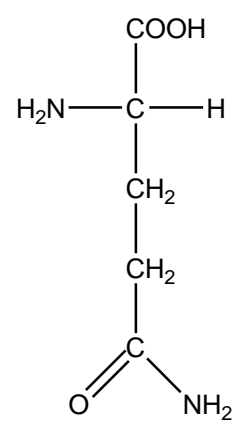
Aspartat



Glutamat

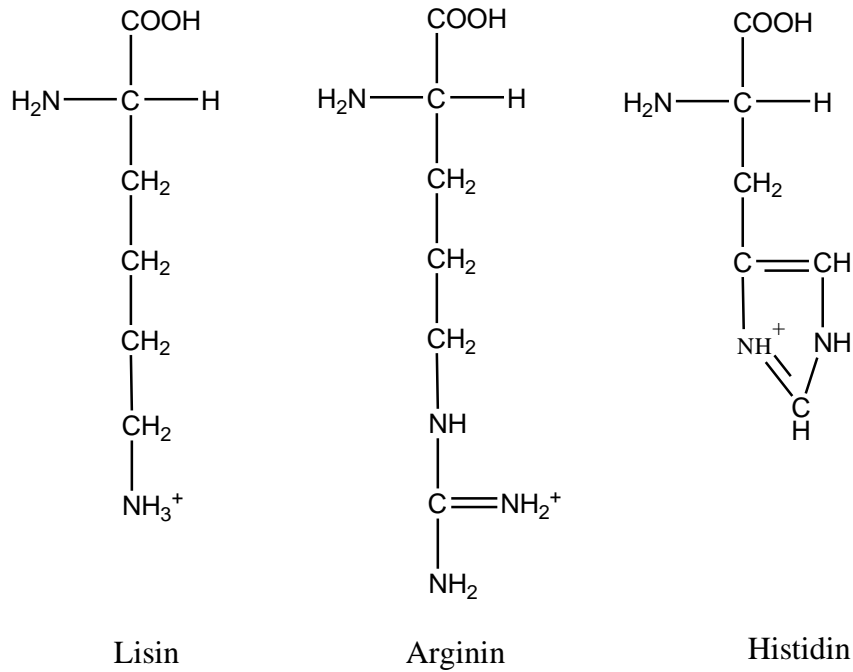


Asparagin



Glutamin

- Bazik (pozitif yüklü ) yan zincire sahip amino asitler: Lysin, arginin, histidin.



## 2.2.2. Amino asitlerin biyolojik özelliklerine göre sınıflandırması

### 2.2.2.1. Protein yapısına giren amino asitler

❖ Esansiyel amino asitler: İnsan ve hayvan dokularında diğer maddelerden sentezlenemeyen amino asit türüdür ve vücutta üretilmediğinden dışarıdan hazır alınması gerekmektedir. Bu yüzden, vücudumuzun bu amino asitlere olan ihtiyacı dışarıdan gıdalar aracılığı ile karşılanmaktadır. İnsan organizması için dışarıdan alınması zorunlu amino asitler; treonin, lösin, valin, izolösin, lizin, triptofan, metiyonin ve fenilalanin olarak sıralanmaktadır ( İbaoğlu vd., 2004).

❖ Yarı esansiyel amino asitler: Yarı esansiyel amino asitler, vücutta üretilmesine rağmen vücudun bu amino asitlere olan ihtiyacı tam olarak karşılanmamaktadır. Organizmanın yarı esansiyel amino asitlere olan ihtiyacının gıdalar yardımı ile giderilmesi gerekmektedir. İnsan için gerekli yarı esansiyel amino asitler ise arginin, tirozin ve histidin olarak sıralanmaktadır ( İbaoğlu vd., 2004).

❖ Esansiyel olmayan (endojen) amino asitler: Vücutta temel organik maddelerden sentezlenebilen amino asitlerdir. Organizmada uzun zaman, besinlerle esansiyel olmayan amino asit almaksızın, bu amino asitlere olan ihtiyacını kendi dokularında gerçekleştirdiği biyosentezler sonucu karşılayabilmektedir. Bu amino asitler; glisin, alanin, sistein, serin, aspartik asit, glutamik asit ve prolin olarak sıralanmaktadır. Besin kaynaklarının farklı olması, amino asit miktarın ve bu proteindeki esansiyel amino asit miktarı da farklı bulunmaktadır ( İbaoglu vd., 2004)

### **2.2.2.2. Protein yapısına girmeyen amino asitler**

❖ Modifiye amino asitler: Proteinlerin yapısına girdikten sonra yapıları değişen amino asitlerdir. Modifiye amino asitler, doğada serbest şekilde mevcut değildir ( İbiş, 2018). Modifiye amino asitler çizelge 2.1.'de gösterilmiştir ( Ekinci, 2018).

Çizelge 2.1. Modifiye amino asitler ( Ekinci, 2018)

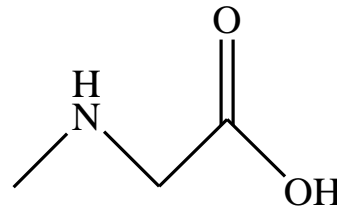
<b>Standart a.a.</b>	<b>Modifiye a.a.</b>	<b>Bulunduğu protein</b>
Prolin	4- OH- prolin	Kollojen
Lisin	5- OH- prolin	Kollojen
Lisin	Desmozin	Elastin
Lisin	6- N- metil lisin	Miyozin ( kas proteini)
Arginin	N- metilarginin	Nükloprotein
Histidin	3- metilhistidin	Birçok enzim, kas proteini
Glutamat	$\gamma$ - karboksiglutamat	Protrombin( koagülasyon)
Serin	Asetilserin	Birçok enzim
Serin	Selenosistein	Enzim( glutatyon peroksidaz)
Serin	o- fosfoserin	Kazein, Birçok enzim

❖ Protein yapısına girmeyen amino asitler: Organizmada çeşitli biyolojik aktivitelere katılmaktadır ( İbiş, 2018). Protein yapısına girmeyen amino asitler Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir ( Ekinci, 2018).

Çizelge 2.2. Protein yapısına girmeyen amino asitler ( Ekinci, 2018)

Amino asit	Biyolojik fonksiyon
$\beta$ -alanin	Pantotenik asitin bileşeni Bazı dipeptid yapıları
$\gamma$ -Amino bütirik asit (GABA)	Nörotransmitter
Dihidroksifenilalanin (DOPA)	
Taurin	
Ornitin	Üre sentezinde ara ürün
Sitrüllin	
Homoserin	AA metabolizmasında ara ürün
Sarkozin	
$\beta$ -Aminoizobutirik Asit	Pirimidin yıkım ürünü (idrar)
Tiroksin (T4 )Tetraiyodotironin	Tiroid hormonu

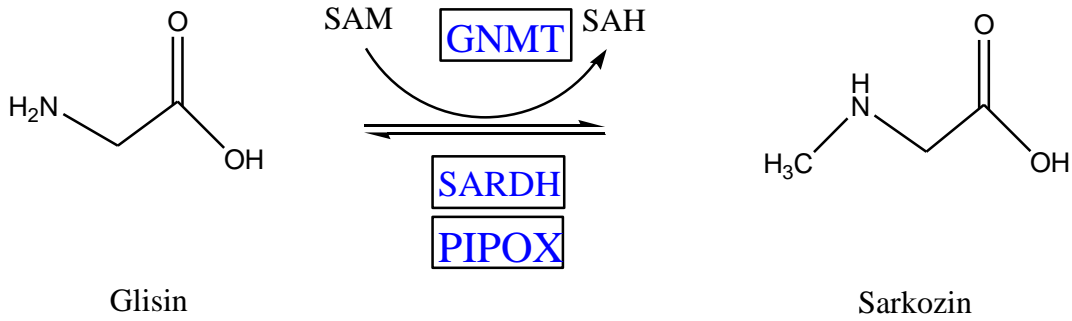
### 2.3. Sarkozin Hakkında Genel Bilgi



Şekil 2.2. Sarkozin molekülünün yapısı

IUPAC adı ; 2-(Metilamino) asetik asit olan ve N-metilglisin olarak da bilinen sarkozin, glisin sentezi ve bozunmasında ara ürün ve yan üründür. Sarkozin; serin, kreatin, purin veya glutatyon kaynağı olarak yaşayan hücrelerin metabolik süreçlerinde, kaslarda ve diğer vücut dokularında bulunan kolin metabolizmasında önemli bir ara madde olarak rol oynayan doğal bir amino asittir. Biyolojik olarak parçalanabilir yüzey aktif maddeler, dış macunları üretiminde ve diğer uygulamalarda kullanılmaktadır. Sarkozin biyolojik materyallerde ve yumurta sarısı, hindi, jambon, sebze, baklagiller gibi gıdalarda bulunmaktadır ( Anonim, 2018).

Sarkozin metabolizmasını düzenleyen başlıca enzimler; glisin N-metil transferaz (GNMT), sarkozin dehidrogenaz (SARDH) ve L-pipiklik asit oksidaz (PIPOX) 'dur. Hücrelerde ise sarkozin, S-adenosilmetoksinin (SAM) bir metil grubunun S-adenosilhomosistein (SAH) ile eşzamanlı üretimi ile glisin'e enzimatik olarak aktarılmasıyla üretilmektedir. Bu reaksiyon, memeli karaciğeri, ekzokrin pankreas ve prostatta yüksek seviyelerde eksprese edilen enzim GNMT ile katalize edilmektedir. Şekil 2.3.'de görüldüğü gibi sarkozin; SARDH ile glisin metabolize edilirken GNMT ile glisinden sarkozin oluşmaktadır ( Khan vd., 2013; Porter, D.H.vd., 1985; Doth G., vd., 2000).



Şekil 2.3. Sarkozin–Glisin reaksiyonu ( Khan, vd., 2013; Kerr, S.J., 1972; Yeo, E.J., Wagner, C., 1994)

İdrarda sarkozini tayin edebilmek için analitik yöntemler;

- İyon değişim sıvı kromatografisi yöntemi ( Cernei vd. 2012)
- Supramoleküler yaklaşım yöntemi ( Biavardi vd., 2012)
- Florometrik yöntem ( Burton vd., 2012)
- Elektrokimyasal enzimatik biyosensör ( Rebelo vd., 2014)
- LC / GC-MS kullanarak bir metabolik prospektif yöntem
- Reflaktometrik girişim spektroskopisi (RIFS) nanosensör ( Diltemiz ve Uslu, 2015)
- Biyomimetik sensör ( Nguy vd., 2017)
- Moleküler baskılı polimere dayanan potansiyometrik sensör ( Özkütük vd., 2016)

Potansiyometrik sensör dışındaki diğer teknikler; rutin analiz için uygun olmayan yüksek enstrümantasyon maliyetleri, karmaşık numune hazırlama ve vasıflı operatör gereksinimi, etkinlik ve manipülasyon açısından pratik sınırlamaları olduğu bulunmaktadır.

Elektroanalitik yöntemler, matris etkilerine karşı daha az hassas olduğundan, diğer tekniklerle karşılaştırıldığında türetme veya zaman harcayan özütleme adımlarına gerek duyulmamaktadır. Potansiyometrik sensörler; hazırlanma ve prosedür kolaylığı, basit enstrümantasyon, nispeten hızlı tepki, geniş dinamik aralık, makul seçicilik ve düşük maliyet gibi birçok avantaj sunmaktadır ( Özkütük vd., 2016).

### 2.3.1. Sarkozinin insan sağlığına etkisi

Son zamanlarda doğal, çok bulunan ve protein olmayan amino asit sarkozin, yeni kabul edilen prostat kanseri markırı olarak araştırılmıştır ( Cernei vd., 2012). Prostat kanseri; tüm kanser vakalarında % 61.4' lük bir insidans ve % 12.1' lik bir mortalite ile Avrupa'da erkeklerde en sık görülen kanser türü olmaktadır ( W.H.O., 2008) ve bu nedenle erken tespiti sağ kalım oranını arttırmak için temel görülmektedir. Günümüzde prostat kanseri olan hastaların tanı ve tedavisi sadece prostat spesifik antijen biyobelirtecinin belirlenmesine dayanmaktadır ( Rebelo vd., 2014).

Biyolojik örneklerde (idrara ve kan plazması) sarkozin konsantrasyonu 1 ila 20  $\mu\text{M}$  arasında değişebilmektedir ( Cernei vd., 2012). Sarkozin konsantrasyonunun kan serumu ve idrarda artış göstermesi sarkozinin prostat kanseri hücrelerini aktive ettiği ve idrarla ölçülen prostat kanseri hücrelerinin malignitesini gösterdiği bildirilmektedir ( Sreekumar vd., 2009). Sarkozin, prostat kanserinin yayılması sırasında büyük oranda artmakta ve idrarda tespit edilebilen farklı bir metabolit olarak tanımlanmaktadır ( Couzin, 2009).

### 2.4. Sarkozin İle İlgili Çalışmalar

Cernei vd. (2012) çalışmalarında; potansiyel bir prostat kanseri belirteci olan sarkozinin spektrometrik ve elektrokimyasal analizi üzerinde çalışmışlardır. İyon değişim sıvı kromatografisi yöntemi kullanılarak, sarkozin tayin limiti  $7 \times 10^{-2}$  mM, lineer aralık 89–5611  $\mu\text{M}$ ; UV- Vis Spektrometresi ile gerçekleştirilen sarkozin tayin limiti  $1.7 \times 10^{-3}$  mM, lineer aralık 0.56–10  $\mu\text{M}$  ve elektrokimyasal yöntem ile  $11 \times 10^{-5}$  mM tayin limiti, lineer aralık 0.07–561  $\mu\text{M}$  bulmuşlardır. Burada, kanser hastalarının idrarı veya plazması gibi çeşitli matrislerdeki tayini için; tatmin edici olan sonuç elektrokimyasal yöntem ile  $11 \times 10^{-5}$  mM sarkozin tayin limiti elde etmişlerdir.

Biavardi vd (2012) çalışmalarında; sarkozinin spesifik saptanması için; bir sarkozin saptama çipinin tasarımına dayanan bir supramoleküler yaklaşım yöntemi üzerinde çalışmışlardır. Sarkozinin, su ve idrarda spesifik olarak tanınması için; reseptör olarak; Tiii-Si polimeri kullanmışlardır. Moleküler düzeyde, tanıma süreci üç etkileşim modunda; katı halde, çözelti içinde ve katı-sıvı ara yüzeyde incelemişlerdir. Sulu ortamda,  $\text{CH}_3\text{-}\pi$  etkileşimlerinin oynadığı glisine karşı sarkozin tam bir seçicilik sağlamıştır. Prostat kanseri formlarının ortaya çıkmasına bağlı olan sarkozinin spesifik tespiti için bir supramoleküler yaklaşım geliştirmişlerdir.

Burton vd. (2012) çalışmalarında; idrar örneklerinde sarkozin tayini için, yeni bir enzimatik teknik üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada, prostat kanseri biyobelirteci analit olarak potansiyeli nedeniyle sarkozin kullanarak, florometrik teknik ile sarkozin tespit etmişlerdir.  $2 \times 10^{-5}$  mM tayin limiti ortaya koymuşlardır. İdrar örneklerinde alanin gibi girişim yapan iyonlar olmaksızın sarkozinin belirlenmesinde uygulanabilir olduğunu ve uygun maliyetli bir teknik olduğunu düşünmüşlerdir.

Rebello vd. (2014) çalışmalarında; biyolojik örneklerde sarkozin tayini için sarkozin oksidaz bileşimli film baskılı elektrot geliştirmişlerdir. Çalışmalarında, film baskılı karbon elektrodun yüzeyine bağlı olarak idrarda sarkozin tayini için basit ve düşük elektrokimyasal bir enzimatik biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör; geniş lineer aralık 10-100 nM, tayin limiti  $16 \times 10^{-6}$  mM ve 60 gün biyosensörün ömrü gibi yüksek analitik performans özellikleri sunmuştur. Biyosensörün sentetik idrar örneklerinde, sarkozinin analizine başarıyla uygulanabileceği sonucuna varmışlardır.

Moein vd. (2014) çalışmalarında; insan plazma ve idrar örneklerinde sarkozin tayini için, LC-MS / MS yöntemi kullanarak yapay moleküler baskılanmış polimerler kullanmışlardır. Ekstraksiyon performansını etkileyen çeşitli parametreler incelemişlerdir ve tayin limiti  $11.2 \times 10^{-6}$  mM, lineer aralık 0.034–112  $\mu\text{M}$  olarak değerlendirmişlerdir. DMIP -LC-MS / MS' nin çok umut verici bir teknik olduğu ve iyi seçicilik ve yüksek duyarlılık ile numune hazırlama sürecinin basitliği gibi önemli avantajlara sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Diltemiz ve Uslu (2015) çalışmalarında; sarkozin saptanması için reflaktometrik girişim spektroskopisi (RIFS) nanosensörleri kullanmışlardır. Çalışmalarında, sarkozini tanıyan MIP tabanlı yeni bir RIFS sensörü, sarkozin baskılı nanopartiküller kullanılarak geliştirmişlerdir. Nanosensörlerin tanıma özellikleri, RIFS ile değerlendirilmiştir. Sarkozin baskılı RIFS nanosensör, sağlıklı insan ve PCa hastasından alınan idrarda sarkozini saptamak için kullanılmıştır. Sonuçlar, PCa hastasında idrardaki sarkozin seviyesinin arttığını ve yeni geliştirilen MIP-RIFS hibrit sensör sistemi ile tespit edilebildiğini göstermişlerdir. Sarkozin baskılı RIFS nanosensörün seçicilik performansı için L-alanin saptaması gerçekleştirmişlerdir. Sarkozin konsantrasyonu açısından iyi bir lineer aralık  $0.25-3 \text{ mM}$  ve  $45 \times 10^{-6} \text{ mM}$  lık bir tayin limiti elde etmişlerdir .

Hashemi Moghaddam ve Hagigatgoo (2015) çalışmalarında; gaz kromatografisi ile sarkozinin analizi için basit bir yöntem geliştirmişlerdir. Özgün sentezlenmiş katı faz mikro ekstraksiyon (SPME) lifi üzerinde, sarkozinin katı faz mikro ekstraksiyonuna dayanmaktadır. Bir monolitik SPME lifi, sarkozinin ekstraksiyonu ve belirlenmesi için gaz kromatografisi ile birleştirilebilecek moleküler baskılanmış polimere dayanarak üretmişlerdir. Üretilen lif ile SPME için; sağlam, ucuz, kararlı ve seçici olduğunu ve sarkozin için yüksek ekstraksiyon etkinliği  $4.1 \times 10^{-3} \text{ mM}$  tayin limiti ile  $11.2-1120 \text{ } \mu\text{M}$  lineer aralık elde etmişlerdir.

Heger vd. (2015) çalışmalarında; förster rezonans enerji transferine (FRET) dayanan prostat kanserinin potansiyel bir biyobelirleyicisi olarak; sarkozinin saptanması için, bir ultrasensitif spesifik biyoalgılama sistemini tarif etmişlerdir. FRET verimliliğine dayanan sarkozin doyma eğrisi,  $50 \times 10^{-9} \text{ mM}$ ' ye kadar tayin limiti ile  $5-50 \text{ nM}$  arasında lineer dinamik aralıkta test etmişlerdir. Daha sonra, prostat adenokarsinomlu hastaların prostatik hücre dizileri ve idrar örneklerinde sarkozin ölçümü için biyosensörü başarıyla uygulamışlardır.

Özkütük vd. (2016) çalışmalarında; moleküler baskılı polimer ( MIP), analit (hedef) molekülü olarak sarkozin, fonksiyonel monomer olarak metakriloamido histidin (MAH) ve çapraz bağlayıcı madde olarak etilen glikol dimetakrilat (EDMA) kullanılarak emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenmişlerdir. Geliştirilen sarkozin sensörünün performansını değerlendirmişlerdir ve sonuç olarak hassas bir potansiyometrik sensörün imal edildiğini



göstermişlerdir. Sarkozin sensörü, yüksek seçiciliği, daha kısa cevap verme süresini (<2 dakika), geniş çizgi aralığı ( $10^{-2}$ - $10^{-6}$  mM), düşük tayin limiti ( $1.35 \times 10^{-7}$  mM) ve tatmin edici uzun vadeli stabilite (> 5.5 ay) olarak bulmuşlardır.

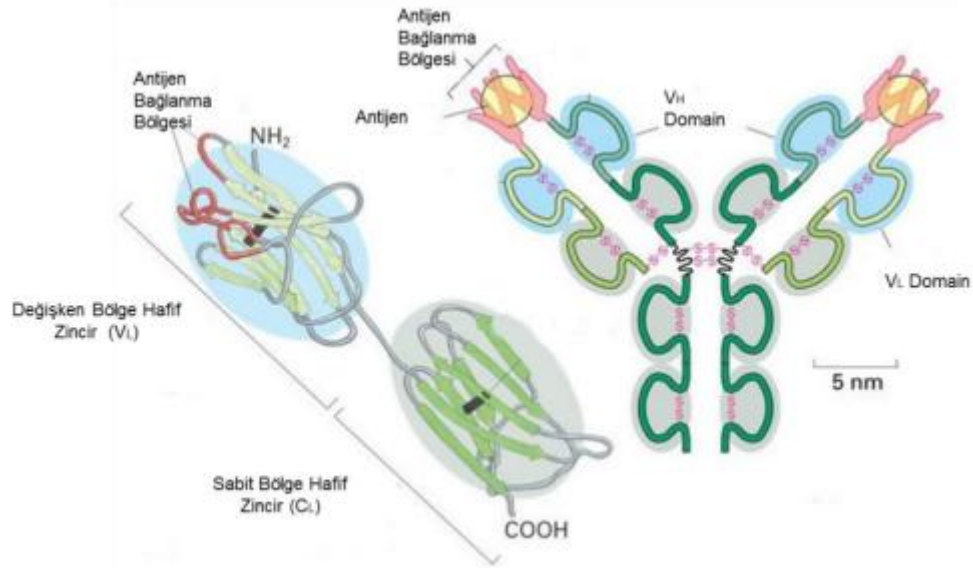
Nguy vd. (2017) çalışmalarında; prostat kanseri için bir biyobelirteç olarak görülen bir molekül olan amino asit sarkozinin tespiti için bir biyomimetik sensörün geliştirilmesi ve optimizasyonu üzerinde çalışmışlardır. Sensör, 0,011–17,9  $\mu$ M lineer aralık ve  $8,5 \times 10^{-6}$  mM tayin limiti ile yüksek analitik performans özellikleri sunmuştur. Sensörün mükemmel bir tekrarlanabilirlik, zamanla iyi bir stabilite ve diğer proteinlere karşı şaşırtıcı derecede düşük çapraz seçicilik gösterdiğini bulmuşlardır.

## 2.5. Antikorlar

İmmünglobulinler bağışıklık sisteminde bulunan, antijen bağlanma alanına sahip olan ve bu sayede kendilerinin oluşmasına neden olan antijenlerle birleşebilme özelliğindeki moleküllerdir. Bu özellikleri sayesinde vücutta reaksiyonlara yol açarlar. Antijen-antikor birleşmesi özgüldür, bir antijen sadece oluşumuna neden olduğu antikor ile birleşebilir. Bu durum günümüzde hastalıkların tanısının konulmasında önemli rol oynamaktadır. Proteinlerin globulinler kısmında yer alan ve immünolojik etkileri olan bu maddelere immünglobulinler denilmektedir. İmmünglobulinler “Ig” şeklinde sembolize edilirler. Dört temel immünglobulin sınıfı tüm memelilerde (IgG, IgM, IgA ve IgE) mevcut olmasına karşın, IgD yalnızca insanda, maymunda, ratlarda ve köpeklerde bulunmaktadır (Akşit vd., 1996; Yılmaz, N., Akgül, Y., 2014).

Antikor molekülleri, dört polipeptid zincirinden meydana gelmektedir. Bu yapı yaklaşık 220 aminoasit (25 kDa) sahip polipeptidlerden meydana gelen iki özdeş hafif (L) zinciri, ve yaklaşık 450-500 aminoasit (50 kDa) sahip iki özdeş ağır (H) zincirden meydana gelir. Amino terminal ucun hafif ve ağır zincir kısımlarındaki ilk 110 ve fazlası kadar amino asit kısmı değişken olup antikorların spesifitesini değiştirmektedir. Yüksek değişkenlik sekansı içeren bu segmentler değişken bölgeler (variable, V bölgesi) olarak adlandırılır, bu bölgeler antijen bağlanma bölgelerini içerir. Karboksi terminal ucundaki sabit bölgeler (constant, C bölgesi) kompleman aktivitesi gibi efektör fonksiyona sahiptir. İki ağır zincir birbirine disülfid bağları ile bağlı olup her bir ağır zincir bir hafif zincire

yine disüfid bağı ile bağlı olmaktadır. Ayrıca zincirlerin kendi içerisinde de disülfid bağları bulunmaktadır. Bunlar zincirler içinde domainlerin oluşmasına sebep olmaktadır. Hafif zincirler bir değişken ( $V_L$ ) ve bir sabit domain ( $C_L$ ); ağır zincirler antikor sınıfına bağlı olarak bir değişken ( $V_H$ ) ve 3 veya 4 sabit domain ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ ) içerir. Antikorların genel yapısı Şekil 2.4.'de gösterilmektedir. ( Yüksel, 2016)



Şekil 2.4. Antikorların genel yapısı

Antikorlar, ağır ve hafif zincirlerden meydana gelen Fab (The fragment antigen binding: antijen bağlama kısmı) parçasından, antijen ile spesifik bir biçimde birleşmektedir. Antikorun antijenle birleştiği bu bölge “paratop” olarak adlandırılır. Y biçimindeki molekülün tek parça halinde kalan ve birçok biyolojik aktiviteden sorumlu gövde kısmına ise soğukta kristalleşme özelliğine sahip olduğundan Fc (Fragment crystallizable: kristalize olabilen parça) olarak tanımlanmaktadır. Fc parçasında sadece ağır zincirler bulunmaktadır ve sert bir moleküldür. Genellikle Ig tipine ve konağa ait olan bir uç ile sonlanır. Bu molekülün Fc parçası rijit olup antikor görevi görmez, bakteri hücrelerine ya da antijene bağlanamaz. Fakat immün hücrelerin yüzeylerindeki reseptörlere bağlanabilmektedir. Dolayısıyla bir antikor molekülü Fab parçalarıyla antijeni tutar, Fc parçasıyla immün hücrelere tutunmaktadır ( Yüksel, 2016).

Antijen-antikor (Ag-Ab) birleşmesi özgüldür. Bir antijen sadece oluşumuna sebep olduğu antikorla birleşebilmektedir. Antijen-antikor birleşmesi, antijen yüzeyindeki epitop

ile antikor molekülünün Fab kısmının ucundaki V bölgesi arasında olur. Ag-Ab birleşmesinde çok kuvvetli olmayan, düşük enerjili bağlar rol oynamakta ve olay tersinir özellikte olmaktadır. Birleşmenin sonunda antijen veya antikor yapısında değişiklik veya parçalanma olmamaktadır. Ag-Ab birleşmesi sırasında iki molekül birbirine ne kadar yakınsa ve bağlanma bölgeleri birbirine ne kadar uygunluk gösteriyor ise bağlanma o kadar güçlü olmaktadır (Anahtar-kilit modelinde olduğu gibi).

Ag-Ab birleşmesi sırasında etkin olan kuvvetler; hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimlerdir.

Elektrostatik etkileşimler, polaritesi yüksek moleküller arasında dipol-dipol etkileşimler veya yüklü moleküller arasındaki itici ya da çekici kuvvetler olabilmektedir. Proteinlerde polipeptit omurgasının karbonil grupları ve polar aminler kalıcı dipollerin oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca polar ve yüklü zincir bölgeleri dipollere katkıda bulunmaktadır.

Hidrojen bağları elektrostatik etkileşimlerin bir alt grubu olarak düşünülebilir. Hidrojen bağları, elektronegatifliği yüksek bir proton alıcı üzerindeki bağlanmamış bir çift elektronla elektronegatifliği yüksek bir proton verici arasında oluşmaktadır. Antikorlarda, amin grupları proton verici ve karbonil grupları, proton alıcı olarak görev yapar. Hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler bağlanmanın gücüne katkıda bulunmaktadır ve sulu çözeltilerde bu etkileşimler, moleküller arası kararlılık için büyük bir katkıya sahip olmaktadır.

Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimlerden daha zayıf dipoller arasında oluşmaktadır. Yakın moleküllerin elektrik alanları bu kuvvetlerden sorumlu geçici dipollerin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu etkileşimler kısmen zayıf olmasına rağmen, birçok etkileşimden oluştuğu için toplam bağlanma şiddetinin %50'sini oluşturabilmektedir. Antikor antijen arası uzaklık 1-2 Å olduğunda bu kuvvetler etkinleşmektedir.

Hidrofobik etkileşimler, yüzeylerinde glisin, alanin, lösin, izolösin gibi hidrofobik aminoasit bulunan iki protein arasında su moleküllerinin itilmesi ile meydana gelen bağlar olmaktadır. Antikor antijen birleşmesinde en önemli rolü bu bağlar üstlenmektedir.

Antikordaki dipoller antijenin dipolleri ile etkileşip bağlanmaya uygun bir yönelmeyi sağlamak için ortak hareket etmektedir. Bu elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları moleküller arası kararlılık için birincil katkı sağlarlar ve diğer güçler tamamlayıcı olarak görev yapmaktadır ( Yazıcı, 2017)

## 2.6. Nanopartikül

Atomsal ve moleküler yapılar seviyesinde, işlevsel materyallerin, sistemlerin ve cihazların geliştirilmesine nanoteknoloji denilmektedir. Son 20 yılda, nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte nanoboyutlu malzemelerin üretilebilmesi sağlanabilmektedir ( Tunca, 2015). Nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoçubuklar, nanoteller gibi farklı sınıflara ayrılan yapılar; nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanmıştır. Temel olarak hepsine nanopartiküller sistemler denilmektedir ( Kavaz, 2011).

Sentetik veya doğal kaynaklı bir makromolekülden oluşan nanopartiküller, boyutları 1-100 nm olan koloidal yapılar olmaktadır. Nanopartiküller yığılmalarını engelleyen koruyucu kabukla çevrelenmiştir ve bu koruyucu kabuk yapıya hem elektrostatik hem de sterik stabilizasyon sağlamaktadır ( Sakallıoğlu, 2013). Nanopartikül malzemelerin çeşitli fonksiyonlar kazandırabilmeleri özelliği ve sahip oldukları başka değişik özelliklerden dolayı yaygın kullanım alanı olduğu kabul edilmektedir. Nanopartikül ve nanokristal malzemelerin üretimlerinde genellikle polimerik yapılar kullanılmaktadır ( Kavaz, 2011). Hazırlanan nanopartiküler sistemler; dayanıklı olması, gerektiğinde sterilize edilebilmesi, fizyolojik ortamda parçalanması, parçalanma ürünleri toksik olmaması, etkin madde/ maddeleri çevresel etkilere karşı koruması, etkin maddeyi hedef bölgeye taşınması ve kontrollü bir şekilde salması beklenmektedir ( Özakar, 2014).

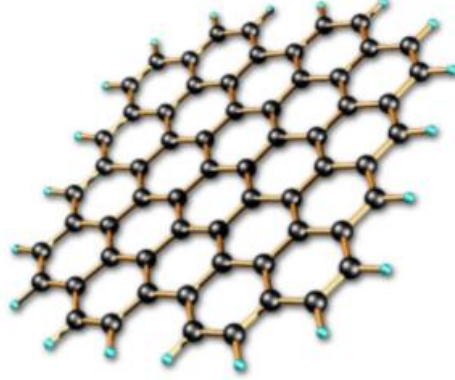
Nanopartiküllerin küçük boyutları nedeniyle eşsiz fizikokimyasal ve morfolojik özelliklere (nanoboyut, yüzey alanı hacim oranının fazla olması) sahip olması en önemli avantajıdır. Nanopartiküller ile bağlanan potansiyometrik sensörlerde, nanopartiküller

potansiyometrik sensörün yüzey alanının artmasını sağlayarak, immobilizasyon veriminin de artmasını sağlamaktadır. Ayrıca, elektron aktarım hızının artmasını sağlayarak; tayin limitlerinin daha düşük olmasına imkan sağlamaktadır. Bu özelliklerinden dolayı diğer ticari malzemelere göre daha önemli olmaktadır. Nanopartiküller; kanser tanı ve tedavisinde, hedefli ilaç salımında, biyosensörler gibi tıp ve biyoteknoloji alanlarında, katalizörler, elektrokimyasal sensörler, optik malzemeler gibi pek çok alanda uygulamaları mevcut olmaktadır. Herhangi bir maddeye dışarıdan mekaniksel veya kimyasal etkilerle enerji verilerek bu maddenin nanopartikül boyutuna parçalanması sağlanabilmektedir ( Kavaz, 2011). Nanopartikül sentezi için farklı yöntemler geliştirilmiştir.

Bu yöntemlerden bazıları;

- Lazer kesme (Laser ablated) yöntemi
- Hidrojen redüksiyonu yöntemi
- Alev sentezi yöntemi
- Mekanik aşındırma yöntemi
- Asal gaz yoğunlaştırma yöntemi
- Kimyasal buhar yoğunlaştırma yöntemi
- Ultrasonik sprey piroliz (USP) yöntemi olmaktadır ( Tunca, 2015).

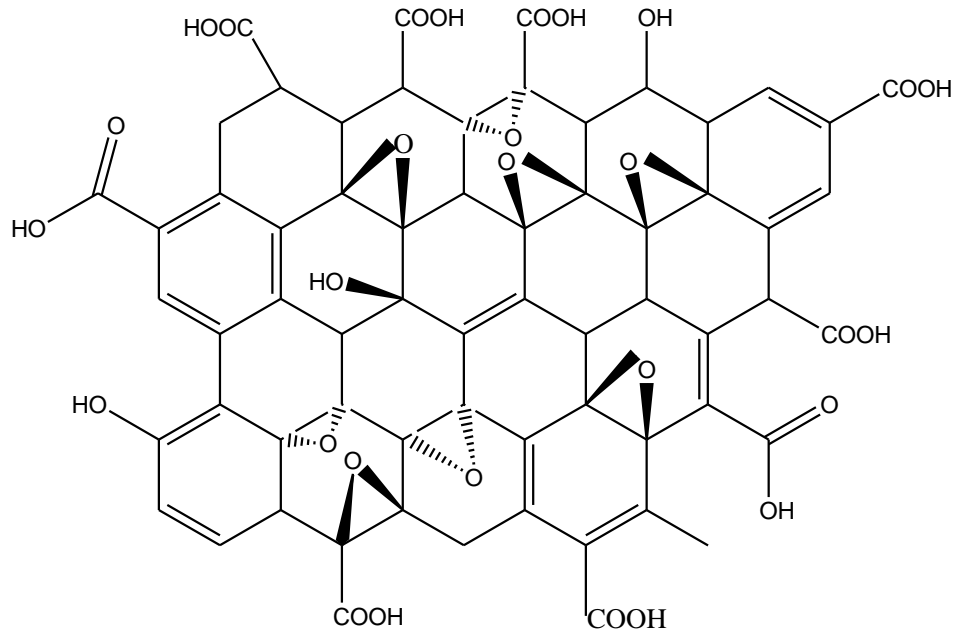
Bir başka nanoboyutlu malzeme olan karbon nanotüpler, bir tüp içine yerleştirilmiş silindirik grafit tabakalardan oluşmaktadır. Tek duvarlı karbon nanotüpler tek bir grafen kabuğundan oluşan silindirik bir yapıya sahipken, çok duvarlı karbon nanotüpler çok sayıda grafen tabakasından oluşmaktadır ( Das vd., 2014). Şekil 2.5' de görüldüğü gibi grafen, kovalent bağ ile bağlı karbon atomlarının bal peteği örgüsünde düzgün dizilmesiyle oluşan iki boyutlu bir nanomateryaldir. Ayrıca, farklı boyutlarda olan diğer bütün grafitik malzemelerin temel yapı taşıdır ( Tiyek, vd., 2016; Çiftçi, 2015 ; Du vd., 2011).



Şekil 2.5. Grafen yapısı ( Du vd., 2011)

Grafen; yüksek esneklik, mekanik mukavemeti, termal iletkenlik, yüksek elektriksel iletkenlik ve şeffaf oluşu gibi benzersiz özelliklere sahiptir. Bu özellikler, grafeni bilimsel ve teknolojik uygulamalarda oldukça fazla ilgi gören bir malzeme yapmaktadır. Ayrıca, grafen kolay hazırlanabilmesi ve işlenebilirliğinden dolayı kimyacılar ve malzeme bilim insanları tarafından tercih edilmektedir ( Kim vd., 2012). Grafen; kimyasal, termal, ultraviyole veya mikrodalga yöntemleri ile sentezlenebilmektedir. Grafen; elektronik ve optik alanda, polimer ve nano kompozit malzemelerde, enerji depolanmasında, sensörler ve analitik uygulamalarda, elektriksel uygulamalarda, katalizör destek maddesi, şeffaf dokunmatik ekranlar, güneş panelleri ve lityum iyon bataryaları gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Çeşitli sensör yapımlarında malzeme olarak kullanılan grafene düşük maliyetli ve esnek amonyak sensörünün geliştirilmesi örnek verilebilmektedir. Ayrıca, endüstriyel gaz sensörü uygulamalarında son yıllarda kullanılmaktadır ( Lu vd., 2011; Yuan ve Shi, 2013; Basu, Bhattacharyya, 2012)

Grafenin bir türevi olan grafen oksit (GO), Şekil 2.6.'da görüldüğü gibi yüzeyinde birçok fonksiyonel grubu içermektedir ( Çiftçi, 2015; Dreyer vd., 2010). Grafen oksitin yapısında farklı oranlarda karbon, oksijen ve hidrojen mevcuttur. 19. yy başından bu yana Brodie, Staundenmaier, Offeman ve Hummers yöntemleri ile üretilebilmektedir. Bu yöntemler, kuvvetli asit ve oksidantlar ile grafitin oksidasyonu ile yapılmaktadır. GO'nun çözücülerde kolay bir şekilde disperse olması, dielektrik özelliği, şeffaflığı, elektronik özelliklerinin ayarlanabilir olması ve mekanik özelliklerinin üstün olmasından dolayı kullanım alanları her geçen gün artmaktadır ( Yazıcı vd., 2016).



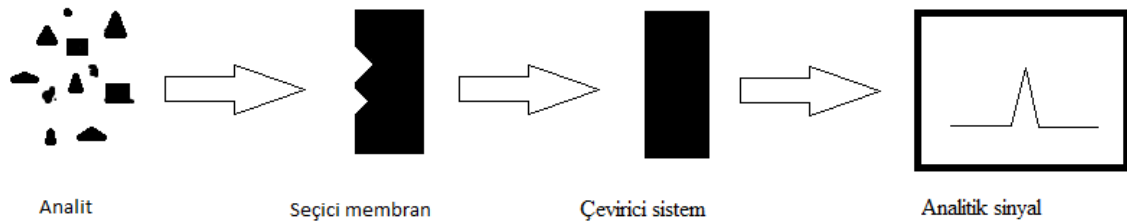
Şekil 2.6. Grafen oksit yapısı ( Dreyer vd., 2010)

## 2.7. Sensörler

Gündelik yaşantımızda ısı, ışık, basınç, ses gibi büyüklüklerin olduğu ve bunların etkilerini duyu organlarımızla algılar, var olduklarını anlamaktayız. Sensörler ile transdüserler, bu fiziksel büyüklükleri duyu organlarımız gibi algılayan ve bunun sonucunda gerekli ekipmanları devreye sokan ve çıkartan elemanlar olmaktadır ( Anonim, 2018).

Işık, basınç, ses, gibi fiziksel ortam değişiklikleri algılayabilen elemanlar “sensör”, aldığı bilgiyi elektrik enerjisine çevirebilen elemanlar ise “transdüser” olarak tanımlanmaktadır. Sensörler; mekanik, termal, elektriksel, manyetik, optik ve kimyasal olarak algılama türlerine göre incelenmektedir.

Genel olarak bir sensörün çalışma düzeneği Şekil 2.7.’deki gibi görülmektedir.



Şekil 2.7. Bir sensörün çalışma düzeneği

### 2.7.1. Kimyasal sensörler

Analizi yapılacak bileşene karşı spesifik bir numune konsantrasyonunun yardımıyla bulunan kimyasal bilginin analitiksel bir şekilde faydalı sinyale dönüştürebilen sistemlere kimyasal sensörler denilmektedir ( Güre, 2005).

Kimyasal sensörlerin özellikleri;

- Analit, hassas bir tabakayla kimyasal bir etkileşimde olmaktadır.
- Hassas tabaka, analite maruz kaldığında kimyasında birtakım değişiklikler gözlenmektedir.
- Aynı kimyasal ölçümlerde kullanılan benzer aletlere göre maliyeti daha az olmaktadır.
- Sadece bir fiziksel veya kimyasal özellik ölçülmesi gerekmez.
- Minyatürize edilebilirler.

### 2.7.2. Kimyasal sensörlerin sınıflandırılması

Kimyasal sensörler genellikle ölçülen büyüklüğe göre ve kullanım alanlarına göre sınıflandırılmaktadır ( Stetter ve Penrose, 2002).

Ölçülen büyüklüğe göre sınıflandırılması:

1. Mekanik: Uzunluk, alan, miktar, kütleli akış, kuvvet, moment, hız, ivme, pozisyon, ses (dalga boyu ve yoğunluğu)
2. Termal: Sıcaklık, ısı akışı



3. Elektriksel: Voltaj, akım, elektrik yükü, direnç, endüktans, kapasitans, dielektrik katsayısı, polarizasyon, elektrik alanı ve frekans,
4. Manyetik: Alan yoğunluğu, akı yoğunluğu, manyetik moment, geçirgenlik
5. Isıma: Yoğunluk, dalga boyu, polarizasyon, faz, yansıtma
6. Kimyasal: Yoğunlaşma, içerik, reaksiyon hızı, pH miktarı

Kullanım alanlarına göre sınıflandırılması:

- A. Optik Sensörler
  - İyonik Sensörler
  - Gaz Sensörler
  - Biyosensörler
  - Elektrooptik ve optomekanik Sensörler
- B. Kütle Sensörler
- C. Elektrokimyasal Sensörler
  - Potansiyometrik Sensörler
  - Amperometrik Sensörler
  - Kondüktometrik Sensörler
  - Voltametrik Sensörler
- D. Termal Sensörler

#### **2.7.2.1. Elektrokimyasal sensörler**

Kimyasal sensörlerin çeşitlilik açısından en geniş grubunu içermektedir. Çevirici olarak elektrokimyasal ölçüm sisteminin kullanıldığı elektrokimyasal sensörler ticari bakımdan da olgunluğa ulaşmıştır.

Ölçüm biçimlerine göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır;

- Voltametri (akım ve potansiyel)
- Amperometri (akım ölçümü)
- Kondüktometri (iletkenlik ölçümü)
- Potansiyometri (voltaj ölçümü)

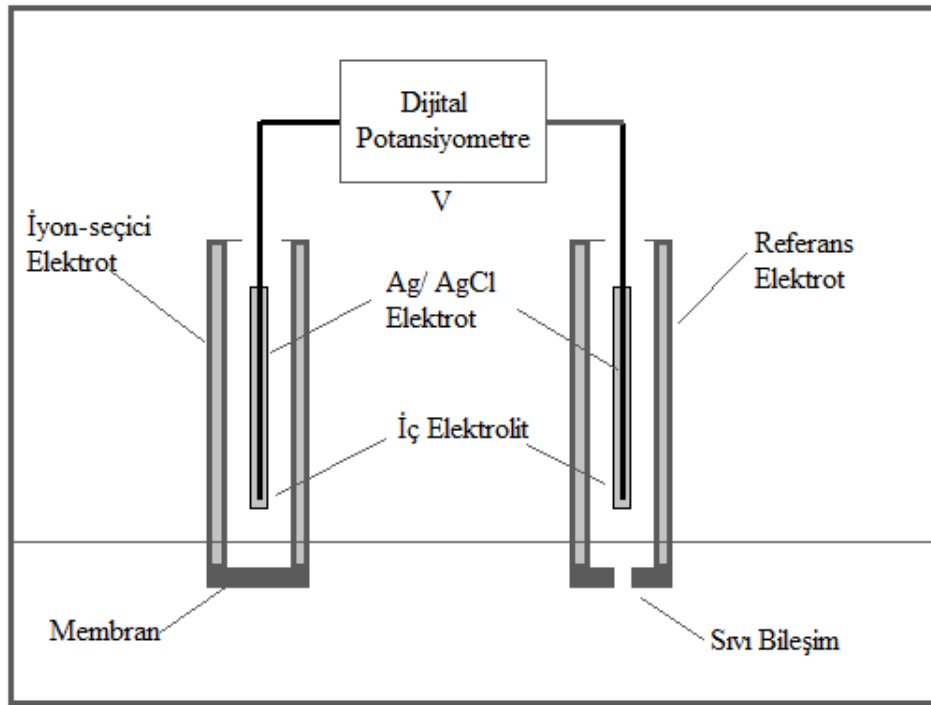
1950 yıllarında, ilk elektrokimyasal sensörler oksijen ölçümü için kullanılmıştır. Sınırlı alan uygulamalarında, yanabilen gaz ve zehirli gaz denetlemeleri için daha seçici olan yeni elektrokimyasal sensörler son yıllarda geliştirilmiş olmaktadır (Skoog vd., 1990).

Elektrokimyasal sensörlerin avantajlardan birisi; ilgilenilen madde için üstün seçicilik göstermesidir. Bu da elektrokimyasal sensörler için önemli bir gelişme olmaktadır (Stetter ve Penrose, 2002). Bu avantaj, amperometrik ve potansiyometrik sensörler için başarı ile gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, farklı numunelere uygulanmaktadır. Önemli unsurlardan birisi de elektrokimyasal sensörlerin minimize edilebilmeleridir.

### **2.7.2.2. Potansiyometrik sensörler**

Potansiyometri, az miktarda akımın geçtiği ya da akımın geçmediği sistemlerdeki, indikatör elektrodun referans elektrota karşı gösterdiği, konsantrasyonun değişmesine bağlı değişiklik gösteren potansiyel ölçümüne dayanan tayin metotudur (Covington, 1974).

Potansiyometride kullanılan cihaza “potansiyometre” adı verilmektedir. Potansiyel ölçümlerinde potansiyometreden başka kullanılan ikinci cihaz pH metredir. pH metre yüksek dirençli cam elektrotların ölçümleri için kullanılırken, potansiyometre düşük dirençli devre ölçümlerinin kullanımı için tasarlanmıştır. Potansiyometrik sistem; bir test hücresi (analit çözeltisi), bu hücreye bağlı bir indikatör elektrot (değişken potansiyel) ve referans elektrot (sabit potansiyel) ile kararlı bir potansiyometre veya pH metreden oluşmaktadır. Bu elemanlara “potansiyometrik hücre elemanları” da denilmektedir (Eren, 2006; Uğurağ, 2013). Şekil 2.8. 'de basit bir potansiyometrik ölçüm sistemi görülmektedir.



Şekil 2.8. Basit bir potansiyometrik sistem

Sistemde, analit çözeltisine daldırılan indikatör elektrodun var olan iyon veya iyonların konsantrasyonundaki değişimine bağlı olarak referans elektroda karşı gösterdiği potansiyelin değişimi ölçülmektedir. Ölçülen bu potansiyel değişimi ile iyonların konsantrasyonlarının tayin edilmesi sağlanmaktadır ( Eren, 2006; Uğurağ, 2013).

Potansiyometrik sensörlerin bir takım özellikleri vardır. Bu özellikler;

- Yüksek konsantrasyonlardaki çözeltilerde sensör tükenebilir.
- Sensörün ömrü, soğuk çevrelerde (60 F altında) 3- 20 ay arasındadır.
- Çalışma ömrü, sıcak ortamlarda 1 yıldan kısadır.
- Genel olarak, ölçümlerden hemen önce sensör test yapılmalıdır.
- Katı- hal sensörlerine göre daha sık test edilmelidir.

Potansiyometrik sensörlerin kullanılmasının bir takım avantaj ve dezavantajları mevcuttur ( Skoog vd., 1998).

Avantajları;

- Elektrokimyasal hücreden elde edilen sinyaller elektrikseldir. Bunun için proseste bir elektriksel sinyal dönüşümü olmasına gerek yoktur.
- Elektrokimyasal ölçümler yaparken son derece küçük hacimlerle çalışılabilir.
- Basit ve ucuz alet kullanılmaktadır.

Dezavantajları;

- Referans elektrot kullanımı zorunludur.
- Atomik emisyon spektroskopisi, kromatografi gibi analitik tekniklerle kıyaslandığında seçicilikleri azdır.

### 2.7.3. Elektrot Çeşitleri

#### 2.7.3.1. Referans elektrotlar

Potansiyeli değişmeden kalabilen ve elektrot potansiyeli bilinen yarı hücreye referans elektrot denir. Referans elektrodun potansiyeli numune çözeltisinde bulunan analitin ve diğer iyonların konsantrasyonuna bağlı olmamaktadır. Potansiyometrik ölçümlerde referans elektrot genellikle anot işlevi görmektedir ( Eren, 2006). Referans elektrotların potansiyelleri sıcaklık değişimlerinden etkilenmektedir ve az bir miktar değişmektedir.

İdeal bir referans elektrodun sahip olması gereken özellikler şöyle sıralanabilir:

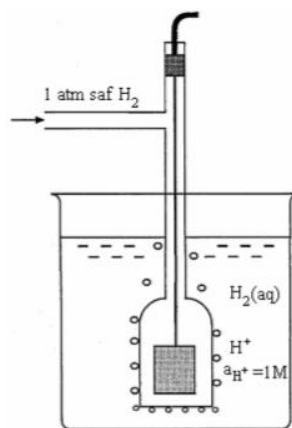
- 1) Değeri tam olarak bilinmeli, numune çözeltisinde bulunan analit ve diğer iyonlardan hiç etkilenmemeli ve zamana bağımlı olmayan sabit bir potansiyel vermelidir.
- 2) Tersinir (tekrarlanabilen sonuçlar vermeli) ve Nernst denklemine uymalıdır.
- 3) Çözeltiden küçük akımların geçmesinden hemen sonra tekrar eski potansiyeline dönebilmelidir.
- 4) Kolay kullanılabilenmelidir.

Yaygın olarak kullanılan referans elektrotlar; referans hidrojen elektrodu, kalomel referans elektrot ve gümüş/gümüş klorür referans elektrotlar kullanılmaktadır (Skoog vd., 1998).

### ➤ Referans hidrojen elektrot

Referans hidrojen elektrot (SHE), yaygın olarak hücre (pil) potansiyeli ve pH ölçümleri için kullanılan elektrottur. Diğer referans elektrot çeşitlerinin potansiyeli SHE'ye göre belirlenmektedir ve bu durum potansiyelin yanında belirtilmektedir. Bundan dolayı, SHE'ye "primer referans elektrot" denir. Diğer referans elektrotlar "sekonder referans elektrotlar" olarak adlandırılmaktadır.

SHE, elektrodun yükseltgen ve indirgen maddelere karşı hassas olması, hazırlanışının, çalıştırılmasının oldukça güç olmasından ve elektrotta kullanılan platinin yüzeyinin birtakım maddelerden zehirlenmesinden dolayı çok ender durumlar için kullanılmaktadır. Bir SHE, Şekil 2.9.'da gösterilmektedir (Yazıcı, 2016).



Şekil 2.9. Referans hidrojen elektrot

### ➤ Kalomel referans elektrot

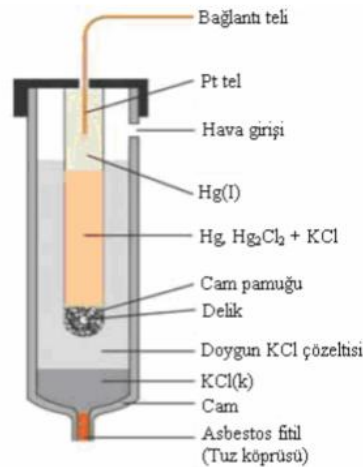
Kalomel referans elektrot çok kolay hazırlanabildiğinden dolayı en fazla kullanılan referans elektrot çeşididir (Şekil 2.10). Kalomel elektrotta civa/civa klorür ara yüzeyi bir tüp içerisinde muhafaza edilir ve doğrudan elektrolitle temas halinde değildir. Bu yüzden,

gümüş/gümüş klorür referans elektroduna göre daha az kirlenmektedir. Bu durum kalomel referans elektrodun kullanımını açısından avantaj sağlamaktadır. Bir kalomel referans elektrot 2.1’ de şematik olarak gösterilmektedir.



Burada  $x$ , çözültideki KCl’ nin molar derişimini ifade etmektedir. Şematik gösterimden görüldüğü üzere KCl ile doyumlanmış olan kalomel elektroda, “doymuş kalomel elektrot” denir. Tüm kalomel elektrotlar  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  (kalomel) yönünden doygundur. Doymuş KCl çözültisi, kalomel elektrotta bir miktar sıvı buharlaşsa da klorür konsantrasyonunun aynı kalması için kullanılmaktadır.

Kalomel elektrodun dezavantajı; yüksek sıcaklık katsayısına sahip olmasıdır. Bu yüzden, elektrodun potansiyeli sıcaklıkla değişir; ancak bu durum ölçümler sırasında yüksek sıcaklık ( $50^\circ\text{C}$ ’ nin üzerindeki sıcaklıklar) değişimlerinin görüldüğü hallerde önemli olmaktadır. Gümüş/gümüş klorür referans elektroduna kıyasla sıcaklıktan daha fazla etkilenmektedir. Kalomel referans elektrodun diğer bir dezavantajı ise içeriğinde bulunan cıvanın toksik bir madde olmasıdır ( Eren, 2006).



Şekil 2.10. Kalomel referans elektrot

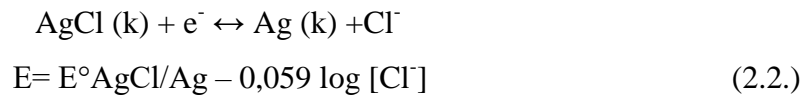
### ➤ Gümüş/Gümüş Klorür Referans Elektrot

Yaygın olarak kullanılan referans elektrotlardan biri olan gümüş/gümüş klorür referans elektrodu, genellikle gümüş ya da platin bir telin yüzeyine gümüş klorürün kaplanmasıyla üretilmektedir. Elektrot ile hücre arasındaki teması gözenekli cam ile sağlanmaktadır. Şekil 2.11’ de bir gümüş/gümüş klorür referans elektrot görülmektedir.



Şekil 2.11. Gümüş/Gümüş Klorür Referans Elektrot

Elektrotda gerçekleşen reaksiyon denklem 2.2.’deki gibidir:



Elektrot potansiyeli tepkimeye göre klorür iyonu derişimine bağı kalır. Ortamda bulunan KCl, elektrotda gerçekleşen indirgenme ya da yükseltgenme tepkimeleri sonucunda elektrodun potansiyelinde gerçekleşebilecek değışime karşı tampon görevi görmektedir. Ayrıca KCl, pH ölçümlerinde girişim yapmaması ve potasyum iyonu ile klorür iyonu mobilitelerinin eşit derecede birbirine yakın olması nedeniyle bu elektrotda çok kullanılan bir elektrolittir. Elektrodun hücreyle olan teması gözenekli bir cam ile sağlanmaktadır.

Gümüş/gümüş klorür elektrodun standart hidrojen elektroduna karşı  $25^{\circ}\text{C}$  sıcaklıktaki elektrot potansiyeli  $0,199\text{ V}$ ' tur. Gümüş/ gümüş klorür elektrodun potansiyeli sıcaklıktan çok az etkilendiği için  $275^{\circ}\text{C}$ ' ye kadar kullanılabilme avantajına sahiptir.

Gümüş/ gümüş klorür elektrot, kalomel elektrotta kullanılan civanın toksik madde olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca oldukça küçük boyutlarda gümüş/gümüş klorür elektrot yapılabilmesi avantajı birçok çalışmada kolaylık sağlamaktadır ( Yazıcı, 2016).

### **2.7.3.2. İndikatör elektrotlar**

İndikatör elektrotlar, potansiyometrik bir hücrede referans elektrot ile birlikte kullanılan, potansiyeli çözelti bileşimine bağlı olarak değişen elektrotlardır ( Anonim, 2016). Analitin aktivitesindeki değişimlere kısa bir sürede cevap veren indikatör elektrot, analite karşı seçicilik göstermesine rağmen diğer iyonlara karşı da tamamen duyarsız değildir. Son zamanlarda bazı iyonlar için iyi derecede seçicilik gösteren çeşitli indikatör elektrotlar yapılmıştır ( Gündüz, 2002).

İndikatör elektrotlar; metalik indikatör elektrotlar ve membran indikatör (iyon seçici) elektrotlar olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir ( Gündüz, 2002).

#### **➤ Metalik indikatör elektrotlar**

İdeal bir indikatör elektrot, analit aktivitesindeki değişimlere hızlı ve tekrarlanabilir cevaplar verir. Tersinir olarak yükseltgenerek iyonlarını oluşturan Ag, Cu, Cd gibi elementler kendi iyonlarının tayininde kullanılır. Ayrıca Pt, Au, Ir gibi inert elektrotlar birden fazla oksidasyon basamağındaki iyonların konsantrasyonlarındaki değişimleri izlemek için kullanılır ( Anonim, 2016).

#### **➤ İyon seçici elektrotlar**

Bir çözeltideki tercihen tek bir iyon ve türe karşı cevap veren elektrotlara “iyon-seçici elektrotlar (ISE)” veya “membran indikatör elektrotlar” denir.



Ölçülen türün aktifliğine duyarlı olan iyon seçici elektrotlar, ölçümler esnasında iyonik şiddetin sabit tutulması, konsantrasyon aktiflikle doğru orantılı olduğundan dolayı önemlidir. Bu sayede ISE ile konsantrasyonlar ölçülmüş olur. Hiçbir elektrot tek bir türe karşı cevap sergilemez, diğer türlere karşı da az miktarda seçici davranmaktadır. ISE' ler genellikle bir türe karşı belirli seçicilik belirtmektedir ( Durgun, 2013).

Bazı katyon ve anyonlara karşı elektrotların hassas ve seçici olması ile alakalı olarak ISE' lerin ortak özellikleri şu şekildedir ( Buck, 1974);

**Minimum çözünürlük:** Deney çözeltisinde (özellikle sulu çözeltilerde), seçici membranların çözünürlüklerinin sifıra yaklaşması beklenmektedir. Bu yüzden, membranların birçoğu, silika camlar ya da polimerik reçineler gibi makro moleküllerden meydana gelmektedir. Ayrıca çözünürlüğü az olan gümüş halojenürler gibi, iyonik inorganik bileşikler kullanılarak da istenilen membranlar hazırlanabilmektedir.

**Elektriksel iletkenlik:** Az da olsa bir membranın elektriksel iletkenliğe sahip olması gerekmektedir. Bu iletkenlik genellikle iyon göçü yoluyla oluşmaktadır.

**Analite karşı seçicilik:** Bir membranda ya da membran matriksindeki bazı türlerin, tayin edilecek olan türü seçici olarak bağlama yeteneğine sahip olması gerekmektedir. Bu bağlama; iyon değişimi, kristalleşme ve kompleksleşme olmak üzere üç şekilde olabilmektedir. ( Skoog, Holler; Nieman, 1998).

### **2.7.3.3. İyon seçici elektrotların avantaj ve dezavantajları**

İyon seçici elektrotlar aşağıdaki avantajlara sahiptirler:

1. Elektrotlar, pek çok kimyasal tür için geniş bir konsantrasyon aralığında doğrusal olarak değişim gösterirler.
2. Bilinmeyen numuneyi ihmal edilebilir ölçüde kirletirler, numunenin bozunmasına neden olmazlar.
3. Elektrotların cevap süreleri genel olarak kısadır (saniye ve dakika seviyelerinde). Bu sebeple; klinik ve endüstriyel numunelerin tayininde kullanılabilir.

4. Spektrofotometrik ölçümler için elverişli olmayan, rengi koyu, bulanık çözeltiler elektrotlar ile kolay bir şekilde ölçülebilmektedir.
5. Özel olarak hazırlanan elektrotlar ile canlı hücrelerin içi gibi değişik yollarla ulaşılamayan zor ortamlarda ölçüm yapılabilmektedir.
6. Elektrotlar, kromatografik ve akış yolu-enjeksiyonu analiz yöntemlerinde dedektör olarak kullanılabilirlerdir.
7. Hem pozitif hem de negatif iyonların derişimi ölçülebilmektedir.
8. Hızlı ve basit bir şekilde kullanılabilirlerdir.

İyon-seçici elektrotların bazı dezavantajları:

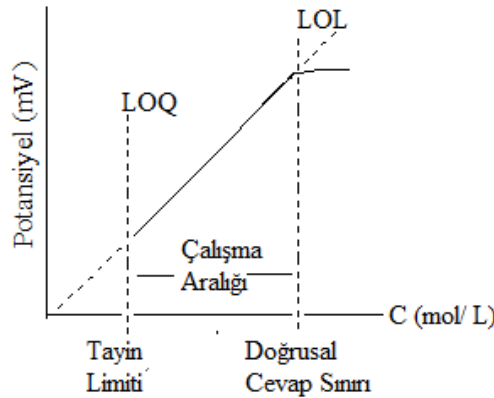
1. Elektrotlarla çalışılırken iyi bir sonuç elde edebilmek için çok dikkatli olmak gerekmektedir.
2. İyon seçici elektrotlarla yapılan ölçümlerin kesinliği nadiren % 1'den daha iyi olup, genellikle daha düşüktür.
3. Elektrotlar, potansiyellerin kararsız olmasına ve kaymasına yol açacak şekilde, proteinler ve diğer organik maddeler vasıtasıyla kirlenebilmektedir.
4. Bazı iyonik türler girişim yapar veya elektrotları zehirlenmektedir.
5. Elektrotlar kompleks halde olmayan serbest haldeki iyonlara cevap vermektedir. Bu yüzden ISE'lerle yapılan ölçümler ortamda ligant bulunmamasını, var olan ligantların da maskelenmesini gerektirmektedir.
6. İyonların tayininin doğruluğu açısından ölçümler sırasında ortamın iyonik şiddetinin sabit tutulması gerekmektedir ( Bektaşoğlu, 2011).

#### **2.7.3.4. İyon seçici elektrotların performans özellikleri**

**pH çalışma aralığı:** ISE'lerin pH çalışma aralığının bulunmasında genelde elektrodun seçici olduğu ana iyonun  $10^{-1}M$ ,  $10^{-2}M$  ya da  $10^{-3}M$  konsantrasyon içeren tampon çözeltiler kullanılmaktadır. Genellikle, tampon çözeltiler için pH 2-12 arasında değişiklik göstermektedir. Tampon çözeltilerin potansiyeli ölçülerek, potansiyel-pH grafiği elde edilir. Potansiyelde ciddi bir değişimin olmadığı pH aralığı, elektrodun pH çalışma aralığı olduğu bulunmaktadır.

**Doğrusal çalışma aralığı:** Elektrot potansiyelinin ölçümleri, analit çözeltisi derişimlerinin eksi logaritmasına karşı grafiğe geçirilerek, oluşan eğrinin lineer kısmının IUPAC'a göre doğrusal çalışma aralığı olarak tanımlanmaktadır. Bir İSE' nin oldukça geniş bir doğrusal aralıkta cevap vermesi istenen bir özelliktir. Doğrusal çalışma aralığının, düşük derişimlerden başlayıp yüksek derişimlere doğru ölçülmesi elektrodun kullanım alanının genişlemesine olanak sağlamaktadır. Literatürdeki çalışmaların çoğunda ISE kalibrasyon eğrileri  $10^{-1}$ - $10^{-5}$ M aralığı için doğrusal bir yanıt gösterdiği gözlenmiştir. Son yıllardaki çalışmalarda, bu doğrusal aralık daha düşük konsantrasyon bölgeleri yönünde genişletmek amacıyla olmaktadır ( Kaplan, 2007).

Miktarsal olarak tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonu tayin limiti (LOQ) kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği (LOL) konsantrasyona kadar olan aralık doğrusal çalışma aralığıdır. Doğrusal çalışma aralığı Şekil 2.12'deki gibidir.



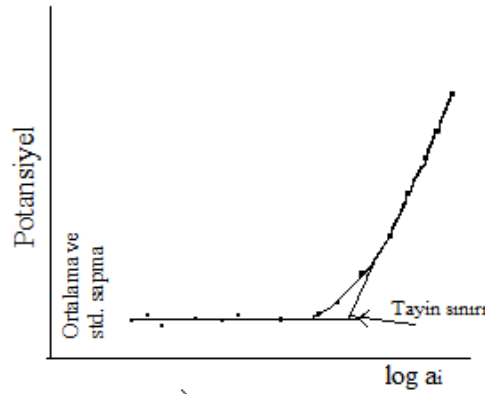
Şekil 2.12. Doğrusal çalışma aralığı

**Duyarlılık:** Birim aktivite başına sinyaldeki değişikliğe duyarlılık denilmektedir ve bir kalibrasyon eğrisinin doğrusal kısmının eğimi, o elektrodun ilgili türe olan duyarlılığını vermektedir. Genel olarak İSE' ler, Nernst eşitliğine göre cevap verirler ( Denklem 2.3.). Bu denkleme göre, analit iyonun yükü olan  $z_i$  nin yükselmesiyle elektrot duyarlılığı önemli bir biçimde azalmaktadır. Tek yüklü bir iyonun her 10 katlık aktivite değişiminde  $59 \text{ mV}$ ' luk EMK değişimi görülürken, çift yüklü bir iyonda bu miktarın yarısının olması beklenmektedir. İSE' lerin bilinen kullanımında, numuneyle İSE elektrodunun faz temas bölgesindeki analit iyonlarının dengeli bir biçimde paylaşılması etkili olmaktadır.  $a_i(\text{org})$

büyükliğünün numuneden bağımsız olması sebebiyle bulunan cevaplar Nernst denkleminde uygun olmaktadır ( Amemiya vd., 1998).

$$E_s = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_i(suda)}{a_i(org)} \quad (2.3.)$$

**Tayin limiti (gözlenebilme sınırı) :** Belirli bir güven seviyesinde tayin edilebilen en küçük analit derişimi veya kütlesi gözlenebilme sınırı olarak tanımlanmaktadır. İSE' ler için, membran ara fazında ölçülebilir bir potansiyel farkı oluşturan en düşük iyon konsantrasyonuna tayin limiti denilmektedir. Şekil 2.13.'de tayin limitinin nasıl belirlendiği grafik üzerinde gösterilmiştir. Şekilde gösterildiği üzere kalibrasyon grafiği iki doğrusal kısımdan oluşmaktadır. Elektrotların tayin limitleri, kalibrasyon grafiğinde görülen düşük derişim seviyesindeki doğrusal kısım ile ara derişim bölgesindeki doğrusal kısmının ekstrapole edilmesi ile meydana gelen kesişme noktasına karşılık gelen aktivite değeri olarak bulunmaktadır ( Buck ve Lindner, 1994).



Şekil 2.13. İSE'lerin tayin sınırlarının belirlenmesini gösteren grafik

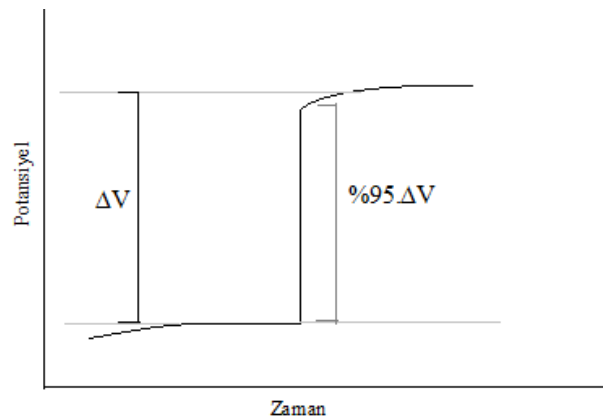
IUPAC'a göre; tayin limiti, tek yüklü anyon ve katyonlara duyarlı elektrotlarda elektrodun sabit potansiyel gösterdiği potansiyel değerinden  $\pm 18$  mV' luk fark sergilediği potansiyel değerine karşı gelen madde miktarı alınmıştır. Çift yüklü anyon ve katyonlarda  $\pm 9$  mV' luk bir potansiyel fark, üç yüklü iyonlarda ise  $\pm 6$  mV' luk bir fark kabul edilmektedir. Çoğu İSE için LOQ  $10^{-5}$  mol/L dolayında olurken, bazılarında bu değer  $10^{-7}$  mol/L'ye kadar düştüğü gözlemlenmiştir. Bu limitler, ortamda mevcut olan bozucu etki yapan iyonlar ve moleküller ile ters yönde etkilenebilmektedir (konsantre sulu çözeltilerde

su molekülleri iyonların hidrofobik membrana girişini önlemekte ve LOQ ters yönde etkilenmektedir).

**Tekrarlanabilirlik:** Analiz işlemlerinde hataların en aza indirgenebilmesi ve analizin güvenilirliğinin sağlanabilmesi için hazırlanan İSE'lerin tekrarlanabilir potansiyeller vermesi istenilen bir özelliktir. Tekrarlanabilirlik, farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerden elektrodun uzaklaştırılıp yıkandıktan sonra tekrar çözeltilere daldırılmasıyla ölçülen bir dizi potansiyel değerlerinin standart sapması olarak kabul edilmektedir.

**Kullanım ömrü:** İSE için en önemli karakteristik özelliklerden birisi olan kullanım ömrü, Nernst yanıtı gösterdikleri zaman olarak tanımlanmaktadır ( Erdem vd., 2000). Elektrotların kullanım ömrü, 10 katlık derişim değışikliğinde belirli periyotlar ile gösterdikleri potansiyel farklar incelenerek belirlenmektedir. Ölçülen bu değerler (potansiyel fark) zamana karşı grafiğe yerleştirilir ve eğimde ciddi bir farkın olduğu süre, kullanım ömrü olarak verilmektedir ( Ngeontaea vd., 2008).

**Cevap süresi:** İSE ile referans elektrodun analit içeren bir çözeltiliye daldırıldıktan sonra dengenin kurulabilmesi için geçen süre olarak bilinen cevap süresi, elektrodun fiziksel yapısıyla ilgili bir özelliktir. IUPAC'a göre, dengenin kurulabilmesi için geçen süre %95' i olarak belirlenip  $t_{95}$  olarak gösterilmektedir ( Buck ve Lindner, 1994). Cevap süresi Şekil 2.14.'deki gösterilmektedir.



Şekil 2.14. IUPAC'a göre cevap süresi( $t_{95}$ )

Bozucu etki yapan türler, Nernst cevabını oluşabilmesi için ana iyonların taşınmasını geciktirmektedir ve bu da, cevap süresini etkilemektedir. Elektrotların cevap sürelerini kısaltmak için aşağıdaki işlemler uygulanabilir;

- Etkili karıştırma (ya da akış hızının yükseltilmesi)
- Elektrot yüzeyinden kirliliklerin uzaklaştırılması veya ufak elektrot yüzeye sahip mikroelektrotların kullanılması
- Çözelti konsantrasyonu ölçüm sırasının düşükten yükseğe doğru olmasıdır.

**Seçicilik:** Elektrodun karakteristik özelliklerinden birisi olan seçicilik, bir numunede uygun bir ölçümün yapılıp yapılamayacağını ölçüsü olarak tanımlanmaktadır. İSE spesifik bir iyonla cevap verirken, incelenen iyonla fiziksel ve kimyasal olarak benzemesi durumunda çözeltide bulunan diğer iyonlara da cevap verebilmektedir. Bu durumda elektrodun, girişim yapan iyon varlığında ana iyonla karşı duyarlılığının bilinmesi gerekir. Elektrodun tersinir olarak cevap verdiği iyonları ve başka türler de bulunan deney çözeltisi içerisindeki elektriksel potansiyel, elektrodun başka türlere olan seçiciliğine göre değişiklik göstermektedir ( Kaplan, 2007). Elektrot, kullanılan iyonoforun sadece ilgili tür ile kompleks oluşturduğu ortamdaki diğer iyonlara karşı seçicilik göstermediği durumda en üst seçicilik sınırına sahiptir. İSE, sadece analit iyonla karşı seçicilik gösterdiğinde en üst seçicilik sınırına sahip olmaktadır. Fakat, her analit için böyle bir durum söz konusu değildir.

#### **2.7.3.5. Seçicilik katsayısını belirlemede kullanılan yöntemler**

İyon seçici elektrotların seçicilik sabitlerini karışık (mixed) çözelti metodu ve ayrı çözelti metodu olarak farklı yöntemler ile hesaplanabilmektedir. Çoğunlukla kullanılan yöntem ise, 1975' de IUPAC tarafından önerilen ve bir karışık (mixed) çözelti metodu olan sabit girişim metodudur ( Umezawa vd., 2000).

#### **➤ Karışık (mixed) çözelti metodları**

Bu metodlar 4 grupta incelenmektedir:

1) Sabit girişim metodu; ISE ve referans elektrottan meydana gelen hücrenin potansiyeli bozucu etki yapan iyon aktivitesi olan  $a_B$ ' nin sabit olduğu ama ana iyon aktivitesi  $a_A$ ' nın değiştiği çözeltiler ile ölçülmektedir. Okunan potansiyel değerlerine karşı ana iyonun aktivitesi grafiğe yerleştirilir. Grafiğin doğrusal kısımlarının ekstrapolasyonu ile elde edilen kesim noktasından bulunan  $a_A$  değerinden yararlanılarak aşağıdaki denklem ile seçicilik katsayısı bulunmaktadır ( Denklem 2.4.)

$$k_{A,B}^{pot.} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.4.)$$

2) İki çözelti metodu; saf ana iyon çözeltisi potansiyeli olan  $E_A$  ile ana iyon ve bozucu etki yapan iyonun karışımından meydana gelen çözeltinin potansiyeli olan  $E_{A+B}$  ölçümüne dayanmaktadır. Seçicilik sabiti potansiyel farkı değeri  $\Delta E = E_{A+B} - E_A$ ' nin denklemde yerine yazılması ile hesaplanmaktadır ( Denklem 2.5.).

$$k_{A,B}^{pot.} = a_A [e^{\Delta E Z_A F / (RT)} - 1] / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.5.)$$

3) Sabit ana iyon metodu; ISE ve referans elektrottan meydana gelen hücrenin potansiyeli  $a_A$ ' nın sabit olduğu ama  $a_B$ ' nın değiştirildiği çözeltiler ile ölçülmektedir. Okunan potansiyel değerleri  $a_B$ ' ya karşı grafiğe yerleştirilir. Grafiğin doğrusal kısımlarının ekstrapolasyonu ile elde edilen kesim noktasından bulunan  $a_B$  değerinden yararlanılarak aşağıdaki denklem ile seçicilik katsayısı bulunmaktadır ( Denklem 2.6.)

$$k_{A,B}^{pot.} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.6.)$$

4) Potansiyel eşitleme metodu; potansiyometrik seçicilik sabitleri aynı koşullar altında aynı potansiyel değişimini verebilen ana iyon ve bozucu etki yapan iyonun aktiviteleri oranı olarak tanımlanmaktadır. Öncelikle; ana iyonun bilinen aktivitedeki ( $a_A$ ) çözeltisi,  $a_A$ ' nın önceden ayarlanmış olan referans çözelti içerisine eklenip potansiyel değişimi kaydedilmektedir. Daha sonra;  $a_B$  aynı potansiyel değişimi kaydedilene dek referans çözeltisi içerisine eklenmektedir. Bu metotta seçicilik sabiti Denklem 2.7.' deki gibi hesaplanmaktadır ( Umezawa vd., 2000).

$$k_{A,B}^{pot.} = (a_A' - a_A) / a_B \quad (2.7.)$$

### ➤ Ayrı çözelti metotları

Ayrı çözelti metodu ile seçicilik sabiti hesaplanması 2 türlü şekilde yapılmaktadır. ISE ve referans elektrottan meydana gelen hücrenin potansiyeli 2 ayrı çözelti ile ölçülmektedir. İlk çözeltide;  $a_A$  aktivitede A iyonu varken hiç B iyonu yoktur ve bu çözeltinin okunan potansiyeli  $E_A'$ 'dir. İkinci çözeltide, ilk çözeltideki iyonunun aktivitesine eşit aktivitede B iyonu ( $a_B$ ) varken A iyonundan hiç yoktur ve bu çözeltinin okunan potansiyeli  $E_B$ 'dir. Bu verilerden yararlanılarak bu metota göre seçicilik sabitleri Denklem 2.8. yardımıyla hesaplanmaktadır. Bu metotta  $a_A=a_B$  durumuna dikkat edilmektedir.

$$\log k_{A,B}^{pot.} = \frac{(E_B - E_A)Z_A F}{RT \ln 10} + (1 - Z_A/Z_B) \log a_A \quad (2.8.)$$

ISE'lerdeki  $\log a$  ve E arasındaki ilişki ana iyon ve bozucu etki yapan iyon için bulunur. Bu ilişki yardımı ile aynı potansiyel değişime sebep olan aktiviteler bulunarak Denklem 2.9.' dan yararlanılarak seçicilik sabitleri belirlenmektedir. Bu yöntemde  $E_A=E_B$  durumuna dikkat edilmektedir ( Umezawa vd., 2000).

$$\log k_{A,B}^{pot.} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.9.)$$

## 2.8. Potansiyometrik Sensör İle İlgili Çalışmalar

Eren (2006), “ Bütünüyle Katı- Hal PVC- Membran ve Kompozit  $NO_3^-$ -Seçici Potansiyometrik Sensörler ve Uygulamaları ” alanında çalışmıştır. Çalışmasında nitrat iyonofor olarak bilinen tetra-do-desil amonyum nitrat kullanılarak bütünüyle katı- hal PVC membran ve kompozit membran nitrat-seçici elektrotlar hazırlamışlardır. Hazırlanan elektrotların potansiyometrik performansları durgun ortamda bilgisayar kontrollü potansiyometrik bir ölçüm sisteminde araştırılmıştır. Hazırlanan kompozit- membran  $NO_3^-$  seçici elektrot akış enjeksiyon analiz tekniğinde dedektör olarak kullanılarak çeşitli çevre numunelerinde (su ve bitki) ve bazı ticari sularda nitrat analizi yapılmıştır.



Dalkıran (2009), çalışmasında makrosiklik bir bileşik olan 8,17-bis(piren-1-ilmetil)-6,7,8,9,15,16,17,18-oktahidrodibenzo[f,m][1,8,4,11] ditiyadiazasiklotetradesin lariat crown (taç) bileşiğinin iyonofor olarak kullanıldığı, cıva(II) iyon-seçici PVC membran elektrot geliştirilmesi ve ömrü, cevap süresi, optimum çalışma aralığı, tayin sınırı, çalışılabilir pH aralığı gibi performans özelliklerini incelemiştir. Tüm ölçümleri, çift temaslı referans elektrot | Analit Çözeltisi | Membran |  $1,0 \times 10^{-3}$  M  $\text{CaCl}_2$  |  $\text{AgCl}$  |  $\text{Ag}$  şeklindeki bir hücre kullanılarak yapmıştır. Elektrodun farklı analitiksel uygulamalarda cıva (II) iyonları için indikatör elektrot olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Bektaşoğlu (2011), “ Ligand Değişimine Dayanan Dimetoat Baskılı Polimerlerin Katı Faz Ekstraksiyonu ve Potansiyometrik Sensör Uygulamaları” alanında çalışmıştır. Çalışmasında, ligand değişimine dayanan dimetoat baskılı polimerlerin hem katı faz ekstraksiyonunda hem de potansiyometrik sensör çalışmasındaki başarısı araştırılmıştır. Çalışmasının ilk aşamasında, Kitosan-Cd(II)-3merkaptopropiltrimetoksilan ve Kitosan-Cd(II) metal şelat monomerleri hazırlanmış ve dimetoat ile etkileştirilerek uygun çapraz bağlayıcılar ile polimerleştirmiştir. Polimerik yapılardan dimetoat baskılı molekülü,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  formaldehit çözeltisi ile uzaklaştırmış ve dimetoat belleklere sahip iki farklı katı destek elde etmiştir. Bu katı destekler; MIP-1 [Kitosan-Cd(II)- 3-merkaptopropiltrimetoksilan-Dimetoat] MIP-2 [Kitosan-Cd(II)-Dimetoat]’dır. İkinci aşamada; dimetoat baskılı polimerik yapılar infrared spektroskopisi ile karakterize etmiş ve bu dimetoat baskılı polimerlerin adsorpsiyon, desorpsiyon işlemlerinde kullanılabilirliği, adsorpsiyon izotermi ve seçiciliklerini incelemiştir. Potansiyometrik sensör çalışmalarında ise bu sensörlerin potansiyel cevabı, cevaplama süresi, seçiciliği ve tekrar kullanılabilirliğini incelemiştir.

Karaçelik (2015), “ Poli(metilen mavisi) Kaplı Altın Elektrot ile Asetilsalisilik Asite Duyarlı Potansiyometrik Sensör Geliştirilmesi ” alanında çalışmıştır. Bu çalışmada altın elektrodu metilen mavisinin elektropolimerizasyonu ile modifiye etmiştir. Poli(metilen mavisi) ve asetilsalisilik asit baskılanmış poli(metilen mavisi) modifiye elektrotların elektrokimyasal özellikleri dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve potansiyometri teknikleri kullanılarak araştırmıştır. Asetilsalisilik asit çözeltilerinde asetilsalisilik asit baskılanmış modifiye elektrodun empedans spektrumunun ve potansiyelinin değiştiği belirlemiştir. Modifiye elektrodun asetilsalisilik asite karşı

potansiyometrik cevabının doğrusal olduğu belirlenmiş olup sensör olarak kullanılabilceğini göstermiştir.

Birinci (2016), “ Risperidon Bileşimine Duyarlı Potansiyometrik Sensör Geliştirilmesi ” üzerinde çalışmıştır. Bu çalışmada, mikro boyutlarda kompozit risperidon-duyarlı sensörler geliştirmiş ve geliştirilen mikro boyutlarda risperidon-duyarlı sensörlerin potansiyometrik özellikleri (seçicilik sabiti, doğrusal çalışma aralığı, tayin limiti, cevap süresi, pH çalışma aralığı, tekrarlanabilirliği, kullanım ömrü) bilgisayar kontrollü ölçüm sistemi ile durgun ortamlarda incelemiştir. Geliştirilen mikro boyuttaki risperidon-duyarlı sensör, sentetik olarak hazırlanan numunelerde uygulamıştır. Sonuçlar sensörün risperidon tayininde kullanılabilceğini göstermiştir.

Çelik (2017), “ Antihipertansif İlaç Etken Madde Olan Atenolole Seçici Potansiyometrik Sensörün Geliştirilmesi ” alanında çalışmıştır. Çalışmada; bir antihipertansif ilaç etken madde olan atenolol (AT) seçici yeni tip PVC membran katı-hal mikrosensör geliştirmiştir. AT-seçici mikrosensörün potansiyometrik performansları durgun ortam ölçümleri ile değerlendirmiştir. AT-seçici mikrosensörün cevap zamanı kısa (<12 s) ve kullanım ömrü uzun (4-6 hafta), hazırlanan AT-seçici sensör  $10^{-2} - 2,5 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>'lik derişim aralığında doğrusal davranış ve atenolole karşı iyi bir seçicilik sergilediğini incelemiştir. Hazırlanan AT-seçici potansiyometrik mikrosensör kullanılarak farmosetik numunede atenolol tayini başarıyla gerçekleştirmiştir.

Arslan (2017), “ Antikanser İlaç Etken Madde Olan Busulfan Seçici Potansiyometrik Sensörün Geliştirilmesi ” alanında çalışmıştır. Çalışmada, antikanser ilaç etken maddelerinden biri olan busulfan' a seçici yeni tip PVC membran katı-hal mikrosensör geliştirmiştir. BUS-seçici mikrosensörün potansiyometrik performansları durgun ortam ölçümleri ile değerlendirmiştir. Sensörün cevap zamanı kısa (<15 s), kullanım ömrü uzun ( 4-6 hafta), geliştirilen sensör  $10^{-2}-2,5 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>'lik derişim aralığında doğrusal davranış ve busulfana karşı iyi bir seçicilik göstermiştir. Hazırlanan BUS-seçici potansiyometrik mikrosensör kullanılarak farmasötik ilaç numunesinde BUS tayini başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Uslu (2018), çalışmasında, dopamin tayinine yönelik olarak üç farklı sensör sistemi geliştirmiştir. Dopamin tayini için, hazırlanan ilk sensör sisteminde 3-APBA ile modifiye edilmiş CuO, ZnO ve CuO-ZnO kompozit nanolif yapıları ile kaplanmış QCM elektrot sistemi kullanılmıştır. İkinci yöntem olarak, moleküler baskılı polimer (MIP) tabanlı potansiyometrik sensör geliştirilmiştir. Üçüncü yöntem olarak ise, karboksi metil dekstran (CMD) ile modifiye çip yüzeylerine 3-APBA ligantı immobilize edilerek reflektometrik interferans spektroskopisi (RIFS) temelli sensör sistemi geliştirilmiştir. Elde edilen analizler sonucunda hesaplanan tayin limiti değerleri QCM, potansiyometrik sensör ve RIFS için sırasıyla  $2 \times 10^{-1} \text{M}$ ,  $3,86 \times 10^{-10} \text{M}$ ,  $6,5 \times 10^{-10} \text{M}$  olarak bulunmuştur.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Sarkozin (2- Metilamino-asetik asit, % 99), grafit tozu, dibutil fitalat (DBF, % 99), glisin ( $C_2H_5NO_2$ , % 99), sodyum hidroksit (NaOH, % 99), potasyum klorür (KCl, % 99) Aldrich firmasından temin edilmiştir. Asetik asit ( $CH_3COOH$ , % 99), nitrik asit ( $HNO_3$ ) Mercek (Germany) firmasından alınmıştır. Deneyleler için kullanılan deiyonize su, EUTECH CYBERNETİCS alpha- CON- 1000 marka deiyonize su cihazından temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

**pH- iyon metre:** Metler Toledo Seven Multi; potensiyel ölçümleri için kullanıldı.

**Manyetik karıştırıcı:** Variomag Multipoint; belirli pH' larda çözelti hazırlamak için kullanıldı.

**Isıtıcı- karıştırıcı:** Heidolph MR3001; çözelti hazırlamak ve karıştırma işlemleri için kullanıldı.

**Hassas terazi:** Ohaus Adventurer- Pro; tartım işlemleri için kullanıldı.

**MALDI-TOF/MS:** Voyager Biyospektrometri STR Work Station; karakterizasyon işlemleri için kullanıldı.

**$^1H$ - NMR:** JEOL GX-400 500 MHz NMR cihazı, karakterizasyon işlemleri için kullanıldı.

**Zeta boyut analizi:** Zeta Sizer Nano Series (Nano-ZS) Malvern Instrument, karakterizasyon işlemleri için kullanıldı.

**Floresans spektrometresi:** Hybrid Biotek Mikroplaka Okuyucu; karakterizasyon işlemleri için kullanıldı.

**SEM:** Zeis Ultra Plus, karakterizasyon işlemleri için kullanıldı.

**CD spektroskopisi:** Dairesel dikroizm spektroskopisi, karakterizasyon işlemleri için kullanıldı.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Fotosensitif biyokonjugasyon yapabilecek amino asit monomer sentezi

ANADOLUCA konsept yöntemine dayanan patentlenmiş rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerden yola çıkılarak MATyr-Ru(bipy<sub>2</sub>)-MATyr (bis(2-2'-bipiridil)-metakriolil tirozin-metakriolil tirozin rutenyum (II) ) sentezlenecektir. ANADOLUCA [AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach] yöntemi; enzim, protein ve antibadi gibi biyomoleküllerin yapısında ve aktivitelerinde bozulma olmadan nano ölçekte sentez olanağı sağlamaktadır. Bu yöntemin amacı; ışığa duyarlı rutenyum bazlı aminoasit monomerleri ve oligomerleri, rutenyum-şelat bazlı monomerler tarafından mikro ve nano yapılar üzerinde ışığa duyarlılık ve konjugasyon yaklaşımı kullanılarak aminoasit monomer-protein çapraz bağlanması hazırlamaktır. Işığa duyarlı aminoasit monomer bağlayıcıları, kimyasal olarak ve biyo-uyumlu birçok farklı mikro ve nano-yüzeye sonra proteine, ışınlama kullanarak tek aşamalı çapraz bağlama reaksiyonu olarak hareket ettiklerinde reaksiyona girebilirler. Mikroemülsiyon polimerizasyon tekniğine dayanan bu yöntem biyomolekülleri rutenyum şelatlarıyla çapraz bağlamaktadır. Hazırlanmış olan nano ölçekli biyomoleküler parçacıkların yapısı, mikroemülsiyon polimerizasyonunun fiziksel ve kimyasal kararlılığıyla güçlendirilmiştir, böylece moleküllerin faaliyetlerinde kayıp olmadan tekrar kullanılmasına imkan sunmaktadır. (R. Say, 2011 [www.wipo.int/patentscope/search/en/WO2011070402](http://www.wipo.int/patentscope/search/en/WO2011070402) Pub.No.:WO/2011/070402; Int. Appl. No: PCT/IB2009.055707).

#### 3.2.1.1. Diklorobis (2-2'-bipiridil) rutenyum (RuCl<sub>2</sub>(bipy<sub>2</sub>)) sentezi

RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub> (0,1 g; 2,06x10<sup>-4</sup> mol) ve 2-2'-bipiridil (0,064 g, 1,3x10<sup>-3</sup> mol) kloroform (30 mL) içinde 1 saat reflaks edilmiştir. Reaksiyonun sonunda çözücüye döner buharlaştırıcı yardımı ile uzaklaştırma yapılmıştır. Kalıntı aseton içerisine konulmuştur. Aseton içindeki çözelti içerisine dietileter ilave edilerek turuncu renkteki maddeye çöktürülme yapılmıştır. Çöken katıyı süzerek ayrıştırılma yapılmıştır. Ayrılan katı, eterle yıkanır ve vakumda kurutulma yapılmıştır (E.N.: 205-210 °C).

### **3.2.1.2. Klorobis (2-2'-bipiridil)MATyr-rutenyum (RuClMATyr(bipyr)<sub>2</sub>) sentezi**

RuCl<sub>2</sub>(bipyr)<sub>2</sub> (0,1 g; 2,064x10<sup>-4</sup> mol) metanol içerisinde çözülme yapılmıştır. Çözelti 0°C' ye kadar soğutulmuş, üstüne N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (triötilenamin) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığına getirilmiş çözelti üstüne metanol içerisinde çözünmüş Ma-T (0,172 g, 4,8x10<sup>-3</sup> mol) damla damla eklenmiş ve arkasından 55 °C' de 2 gün reflaks edilmiştir. Reaksiyonun sonunda çözücünün uzaklaştırılması yapılmıştır. Kalıntı diklorometan içerisinde çözülüp, 3 kez H<sub>2</sub>O ile ekstrakte edilmiştir. Organik fazlar toplanıp, MgSO<sub>4</sub> (magnezyum sülfat) ile kurutulma yapılmıştır. Çözücü rotary evaporatörde uzaklaştırılıp sırası ile eterle yıkama ve vakumda kurutma işlemleri yapılmıştır (E.N.: 125-128 °C).

### **3.2.1.3. Bis (2-2'-bipiridil) bis-MATyr-rutenyum (RuMATyr(MATyr)(bipyr)<sub>2</sub>) sentezi**

RuClMATyr(bipyr)<sub>2</sub> (0.1 gr; 1,43x10<sup>-4</sup> mol) MetOH içerisinde çözülme yapılmıştır. MA-T (0,172 g, 4,8x10<sup>-3</sup> mol), DMSO içerisinde çözünmüş ve oda sıcaklığında damla damla birinci çözelti içerisine eklenmiştir. Karışıma 110°C' de 6 saat karıştırılma işlemi yapılmıştır. Solventler düşük basınç altında çıkarılıp tortu, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içine alınmıştır. Organik katman, H<sub>2</sub>O (3x10 mL) ile yıkanmış, MgSO<sub>4</sub> üstünde kurutulma yapılmıştır. Son olarak eterle yıkanıp, vakum altında kurutulma işlemi yapılmıştır (E.N.:> 220 °C).

### **3.2.2. Nano-anti C reaktif protein antibadinin sentezi**

Nano-anti-C reaktif protein (CRP) antibadinin hazırlanması için; ilk olarak, anti-CRP antibadi, ANADOLUCA yöntemine göre azot atmosferi altında, MATyr-Ru(bipyr)<sub>2</sub>-MATyr ile çapraz bağlanmıştır. Daha sonra, MATyr-Ru(bipyr)<sub>2</sub>-MATyr ile çapraz bağlanmış anti-CRP antibadi mikroemülsiyon polimerizasyon ortamına eklenmiştir (PVA'nın (polivinil alkol) saf su içinde dağıtılmasıyla hazırlanır). Reaksiyon ortamına amonyum persülfat eklenmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında azot atmosferi altında gün ışığında 48 saat boyunca meydana gelmiştir. Son olarak, reaksiyonun sonunda nano-anti-CRP antibadi, reaksiyon ortamından 6000 rpm'de santrifüjleme ile ayrıştırılıp; reaksiyona girmemiş türleri çıkarmak için saf su ile yıkanmıştır.

### 3.2.3. Anti-C reaktif protein antibadi konjuge grafen oksitin sentezi

Anti-CRP antibadi-GFOX için; MATyr-Ru(bipyr)<sub>2</sub>-MATyr hazırlanmasından önce çapraz bağlı grafen oksit hazırlanmıştır. Bu çapraz bağlama prosedürü, NHS/EDC çapraz bağlama yaklaşımına dayanmaktadır. Böylece; grafen oksit, 0.1 M NHS ve 0.4 M EDC ile etkileşime girmiştir. Daha sonra reaksiyon ortamına 150 µL MATyr-Ru(bipyr)<sub>2</sub>-MATyr eklenmiştir. Reaksiyon azot atmosferi altında 12 saat boyunca meydana gelmiştir. Reaksiyondan sonra, reaksiyon ortamına 1000 ppm anti-CRP antibadi ilave edilip; anti-CRP antibadi-GFOX hazırlanmıştır.

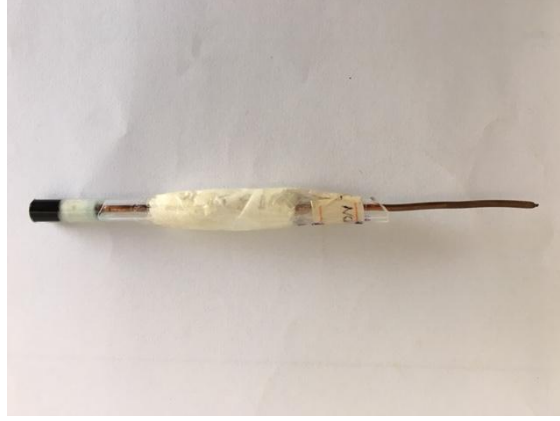
### 3.2.4. Hazırlanan malzemelerin potansiyometrik sensör yapımında kullanımı

#### 3.2.4.1. Polimerli karbon pasta elektrodun (sensörün) hazırlanması

Membran bileşiminde yer alan maddeler; 200 mg grafit tozu, 125 µL polimer, 15 µL dibutil fitalattır.

İlk olarak; sensörün hazırlanması için spektroskopik saflıkta 200 mg grafit tozu ve 15 µL dibutil fitalat içeren karışım bulamaç haline gelene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra üzerine nano-anti-CRP potansiyometrik sensör için, 125 µL nano anti-CRP antibadi polimeri ve anti-CRP-GFOX potansiyometrik sensörü için ise, 125 µL anti-CRP-antibadi-GFOX polimeri eklenerek karışmaya bırakılmıştır. Karışım uygun kıvama geldiğinde 15 cm uzunluğundaki 5-6 mm çapındaki cam boruların içine 0,5-1 mm kalınlığında ve 5-15 cm uzunluğundaki bakır teller pamuk yardımıyla boruya sıkıştırılmıştır. Hazırlanmış olan karışım cam boruların içine doldurularak, 1 gece kurumaya bırakılmıştır.

Hazırlanan elektrotlar kuruduktan sonra elektrot yüzeyi, pürüzsüz bir kağıt üzerinde düzleştirilmiştir. 10<sup>-3</sup> mM sarkozin çözeltisinde bekletilerek şartlandırılmıştır. Her ölçümden önce membran ve referans elektrot çifti deiyonize suyla yıkanıp kurulanmıştır. Potansiyel ölçümleri Ag/AgCl referans elektroduna karşı Metler Toledo Seven Multi pH/iyonmetreyle yapılmıştır. Her ölçümden sonra sensör yaklaşık 45 dk 0,1M asetik asit ve 1M KCl ile muamele edilmiştir. Elektrot kullanılmadığı zamanlarda deiyonize suda bırakılarak bekletilme işlemi yapılmıştır.



Şekil 3.1. Polimerli karbon pasta elektrot

### 3.2.4.2. Kontrol karbon pasta elektrodun hazırlanması

Membran bileşiminde yer alan maddeler; 400 mg grafit tozu, 100  $\mu$ L dibutil ftalattır.

İlk aşamada; elektrodun hazırlanması için spektroskopik saflıkta 400 mg grafit tozu ve 100  $\mu$ L dibütil ftalat karıştırılarak bulamaç haline getirilmiştir. Karışım, 15 cm uzunluğundaki 5-6 mm çapındaki cam boruların içine 0,5-1 mm kalınlığında ve 5-15 cm uzunluğundaki bakır teller pamuk yardımıyla boruya sıkıştırılmıştır. Hazırlanmış olan karışım cam boruların içine doldurularak, 1 gece kurumaya bırakılmıştır.

Hazırlanan elektrotlar kuruduktan sonra elektrot yüzeyi, pürüzsüz bir kağıt üzerinde düzleştirilmiştir.  $10^{-3}$  mM sarkozin çözeltisinde bekletilerek şartlandırılmıştır. Her ölçümden önce membran ve referans elektrot çifti deiyonize su ile yıkanıp kurulanmıştır. Potansiyel ölçümleri Ag/AgCl referans elektroduna karşı Metler Toledo Seven Multi pH/iyonmetreyle yapılmıştır. Her ölçümden sonra sensör yaklaşık 30 dk 0,1M asetik asit ve 1M KCl ile muamele edilmiştir. Elektrot kullanılmadığı zamanlarda deiyonize suda bırakılarak bekletilme işlemi yapılmıştır.

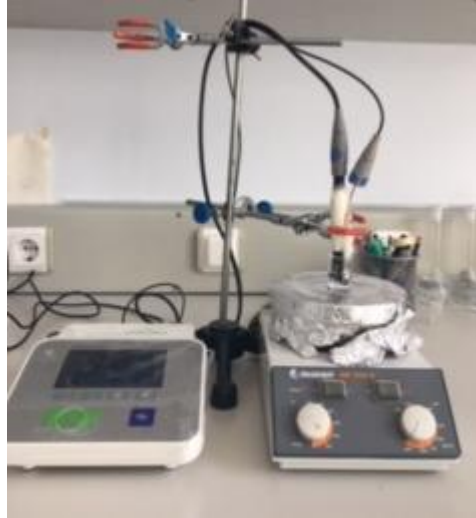




Şekil 3.2. Kontrol karbon pasta elektrot

### **3.2.4.3. Potansiyel ölçüm sistemi**

Ölçümden önce membran ve referans elektrot çifti deiyonize su ile yıkanıp kurulanmıştır. Potansiyel ölçümleri Ag/AgCl referans elektroduna karşı Metler Toledo Seven Multi pH/iyonmetreyle yapılmıştır. Her ölçümden sonra sensör yaklaşık 45 dk 0,1M asetik asit ve 1M KCl ile muamele edilmiştir. Elektrot kullanılmadığı zamanlarda deiyonize suda bırakılarak bekletilme işlemi yapılmıştır. Şekil 3.3. 'de potansiyometrik ölçüm sistemi gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Potansiyel ölçüm sistemi

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

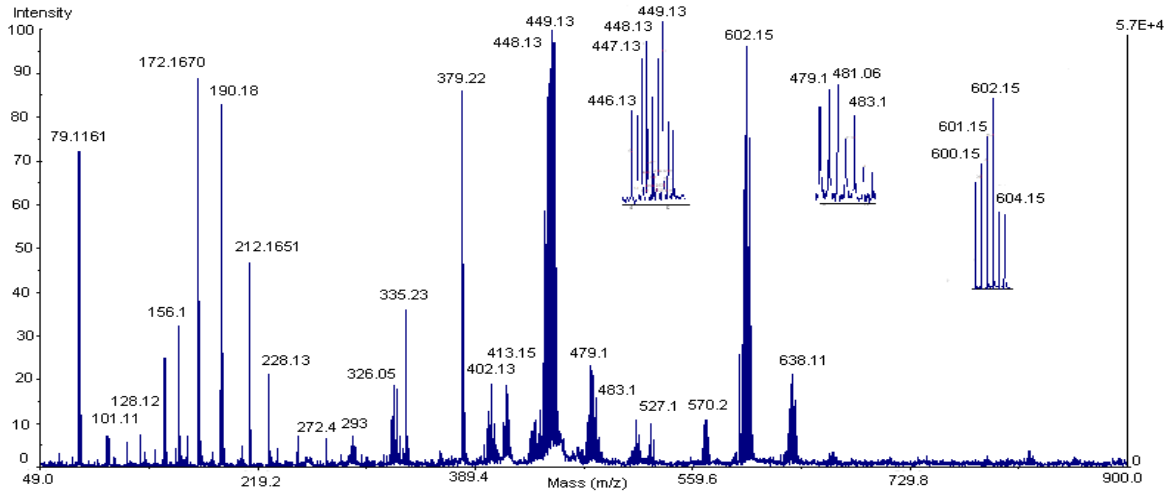
### 4.1. Karakterizasyon

Rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerden elde edilen MAT-Ru-MuABt ANADOLUCA (Say R., 2009) yaklaşımıyla sentezlenip, karakterizasyonu incelenmiştir. Rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerin karakterizasyonu için, MALDI-TOF/MS (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) ve <sup>1</sup>H NMR'ı kullanılmıştır.

Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonunda; partikül ebadını belirlemek için Zeta boyut analizi ve SEM ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin floresans özelliğini belirlemek için floresans spektrometresi ve yapısındaki değişiklikleri belirlemek amacıyla CD spektroskopisi kullanılmıştır.

#### 4.1.1. Diklorobis (2-2'-bipiridil) rutenyum karakterizasyonu

MALDI-TOF/MS kütle spektrumu, bir Voyager Biyospektrometri STR Work Station'da alınmıştır ve 337 nm'lik bir pulslu azot lazer kullanılmıştır. Hızlanma voltajı 20 kV'a ve gecikme süresi ise 100 ns ayarlanılmıştır. Kütle analizi pozitif reflektör modunda gerçekleştirilmiştir ve gecikmeli ekstraksiyon modunda yapılmıştır.  $\alpha$ -siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) matris çözeltisi kullanılmış ve 10 mg CHCA, 1:1 oranında hazırlanmış 1 mL %0,3 TFA solüsyonu ve asetonitril çözeltisi içerisinde çözülme yapılmıştır. 2  $\mu$ L numune çözeltisi, asetonitril/%0,3 TFA içerisindeki 23  $\mu$ L 10 mg/mL'lik CHCA ile karıştırılma yapılmıştır. Bu karışım (1  $\mu$ L) bir MALDI-TOF/MS numune plakası üstüne yerleştirilmiş ve kurumaya bırakılma işlemi yapılmıştır.

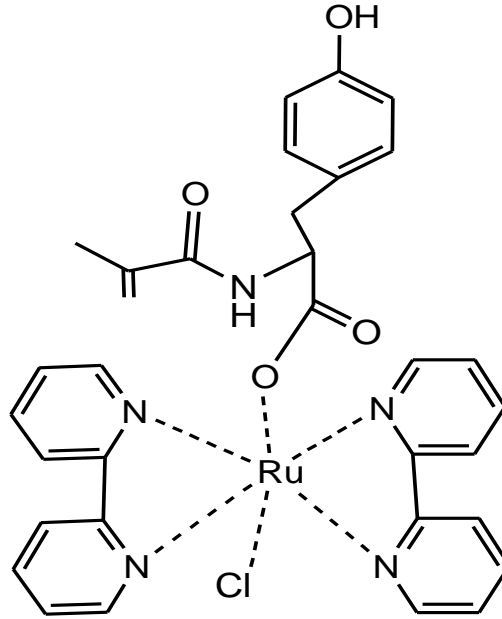


Şekil 4.1. MALDI-TOF/MS Ru(bipy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> spektrumu

Şekil 4.1’de MALDI-TOF/MS Ru(bipy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> spektrumu gösterilmektedir. İyon, bipyridil ile ilgili olarak 79, 128 ve 157 m/e’de tepe noktaları olmaktadır. m/e 101, 413 sırasıyla Ru ve Ru(bipy)<sub>2</sub>’yi göstermektedir. m/e 293, 327, 448 ve 484 sırasıyla RubipyrCl, RubipyrCl<sub>2</sub>, Ru(bipy)<sub>2</sub>Cl ve Ru(bipy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Bu spektrumda Ru(bipy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> yapısının tam olarak üretildiği teyit edilmiştir. m/e 172, 190, 212 ve 379 ise CHCA matriksiyle ilgilidir.

#### 4.1.2. Klorobis(2-2’-bipiridil)MATyr-rutenyum karakterizasyonu

RuClMATyr(bipy)<sub>2</sub> <sup>1</sup>H-NMR spektrumu, CDCl<sub>3</sub> içinde JEOL GX-400 500 MHz NMR cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Kimyasal kaymalar (δ ppm) cinsinden CDCl<sub>3</sub> referans alınarak rapor edilmiştir.



Şekil 4.2. Klorobis (2-2'-bipiridil) MATyr-Rutenyum

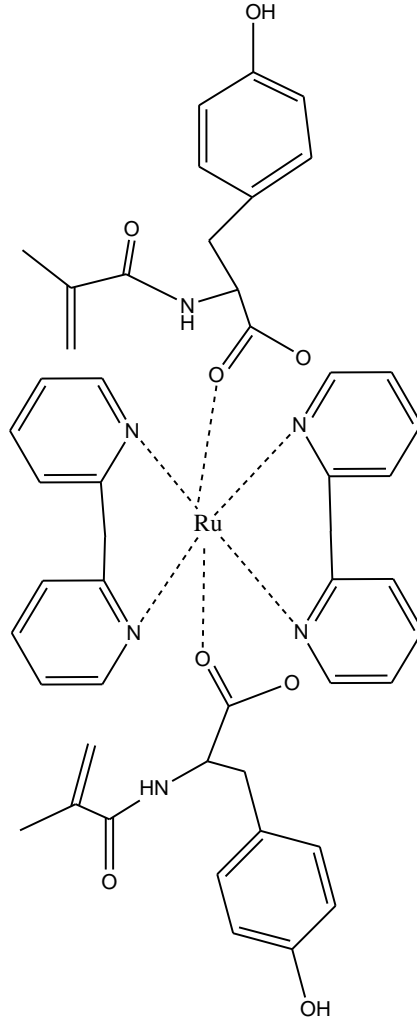
Şekil 4.2'de moleküler yapısı görülmekte olan Klorobis (2-2'-bipiridil) MAT-Rutenyum için;

Elementel analiz:  $C_{33}H_{33}ClN_5O_4Ru$ : Deneysel: C 56.75%, H 5.01%, N 10.23%, Teorik: C 56.85%, H 4.34%, N 10,05%.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ), ppm: 9.7 (d, 4H,  $^3J= 5.08$  Hz), 8.56 (d, 4H,  $^3J= 7.92$  Hz), 7.92 (t, 4H,  $^3J= 7.82$  Hz), 7.3 (t, 1H,  $^3J= 7.4$  Hz), 7.23 (t, 2H,  $^3J= 7.47$  Hz), 7.18 (d, 2H,  $^3J=7.46$  Hz), 7.12 (t, 4H,  $^3J= 6.30$  Hz), 5.3 (d, 1H,  $^2J= 1.52$ Hz), 5.3 (d, 1H,  $^2J= 1.54$  Hz), 1.8 (s, 3H).

#### 4.1.3. Bis (2-2'-bipiridil)bis-MATyr-rutenyum (II) karakterizasyonu

$RuMATyr(MATyr)(bipy)_2$   $^1H$ -NMR spektrumu,  $CDCl_3$  içinde JEOL GX-400 500 MHz NMR cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Kimyasal kaymalar ( $\delta$  ppm) cinsinden  $CDCl_3$  referans alınarak rapor edilmiştir.



Şekil 4.3. Bis(2-2'-bipiridil)bis-MATyr-rutenyum (II)

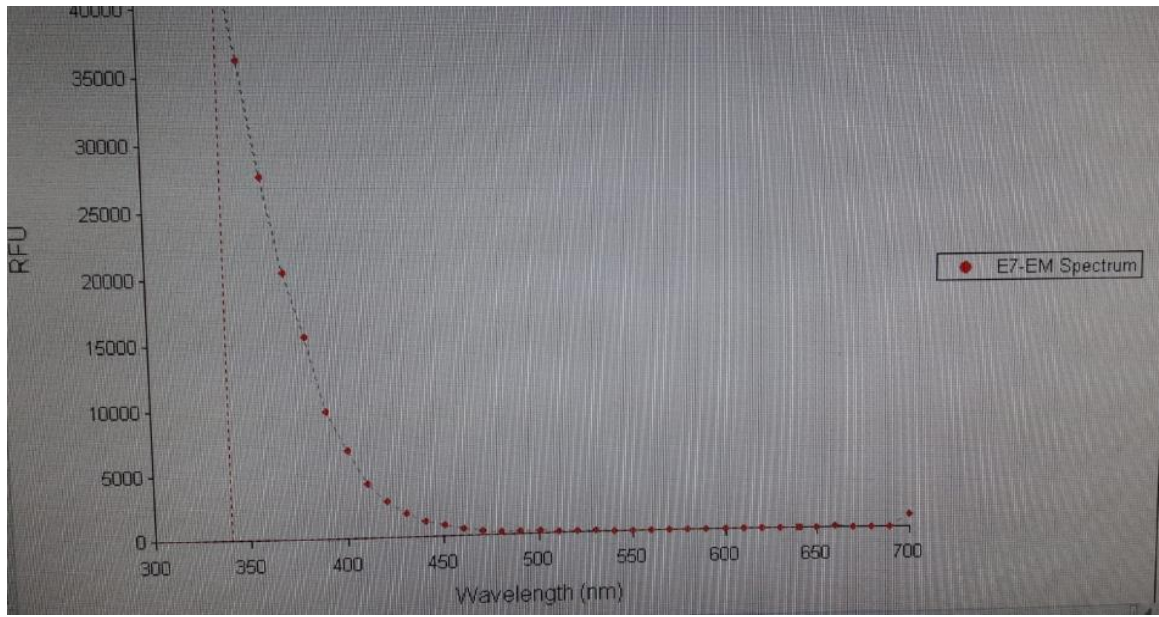
Şekil 4.3'de moleküler yapısı görülmekte olan Bis(2-2'-bipiridil)bis-MATyr-rutenyum (II) bileşiği için;

Elementel analiz:  $C_{50}H_{46}N_8O_6Ru$ : Deneysel: C 61.97%, H 4.3%, N 10.8%, Teorik.: C 62.82%, H 4.85%, N 11.72%.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ), ppm: 10.74 (d, 2H,  $J=14.9$ Hz), 9.76 (s, 1H), 7.99 (d, 1H,  $J=7.68$  Hz), 7.91 (d, 1H,  $J=7.57$  Hz), 7.54 (d, 2H,  $J=7.94$  Hz), 7.46 (d, 1H,  $J=8.2$  Hz), 7.31 (t, 4H,  $J=6.76$  Hz), 7.16 (s, 1H), 7.1 (d, 2H,  $J=11.7$  Hz), 7.07-7.00 (q, 5H,  $J=8.0$ Hz), 5.6(d, 2H,  $J=6.6$ Hz), 5.3 (s, 2H), 4.57(m, 1H), 4.39(m, 2H), 1.24 (s, 3H).

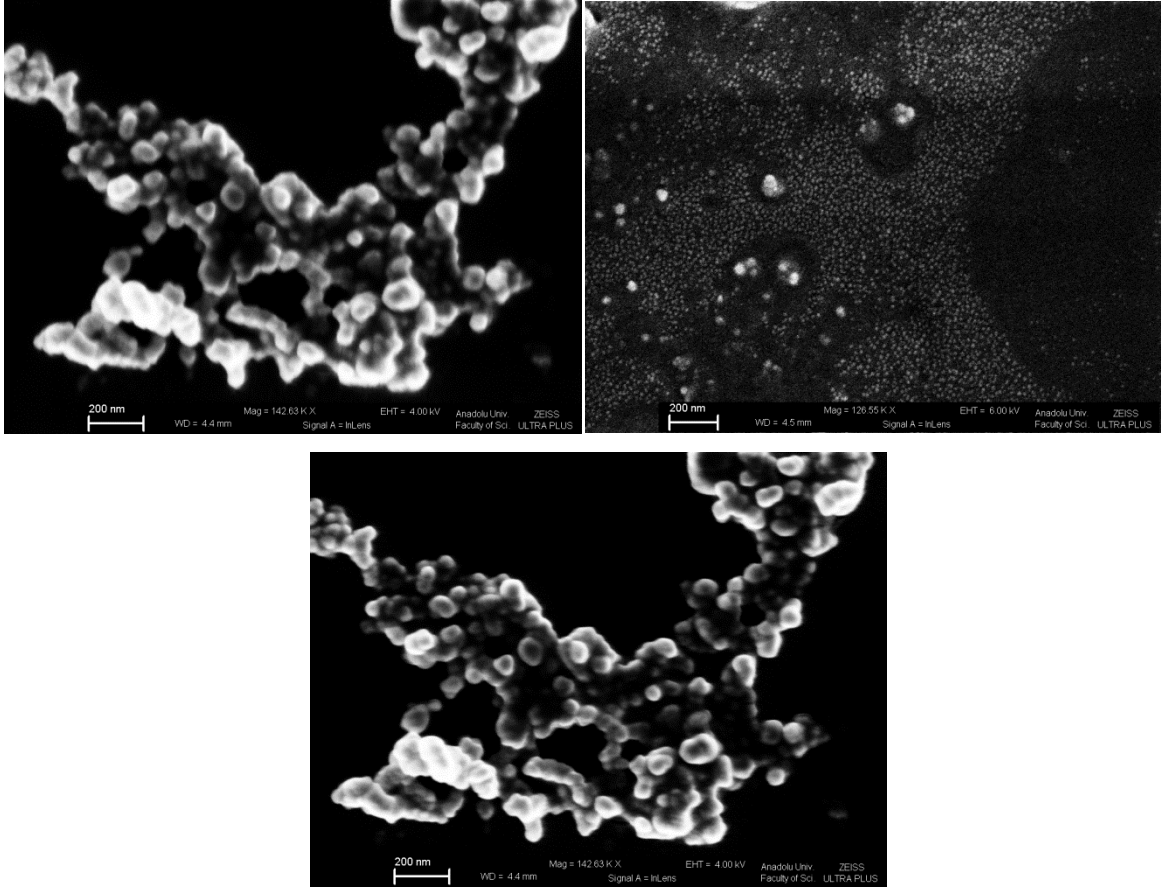
#### 4.1.4. Nano-anti-C reaktif protein antibadinin karakterizasyonu

Sentezlenen nano-anti-CRP antibadi floresans spektrumunu için Hybrid Biotek mikropşaka okuyucu cihazı kullanılmıştır. Sentezlenen nano-anti-CRP antibadi, 1000 ppm' de 1 mL nanopartikül saf su ile 3 mL'ye seyreltilmiştir. 300 nm uyarma dalga boyu ile floresans spektrumu, 320-700 nm aralığında taramayla elde edilmiştir. Şekil 4.4.' de görüldüğü üzere, nano-anti-CRP antibadi floresans spektrumunda en yüksek pik 690 nm'de alınmıştır.



Şekil 4.4. Nano-anti-CRP antibadi floresans spektrumu

Nano-anti-CRP antibadinin taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleri alınarak nanopartiküllerin yapısındaki boyut dağılımı hakkında bilgi edinilmiştir. Şekil 4.5' deki elde edilen görüntüler incelendiğinde nanopartiküllerin boyutlarının ortalama 200 nm civarında olduğu görülmektedir.



Şekil 4.5. Nano-anti-CRP antibadının SEM görüntüleri

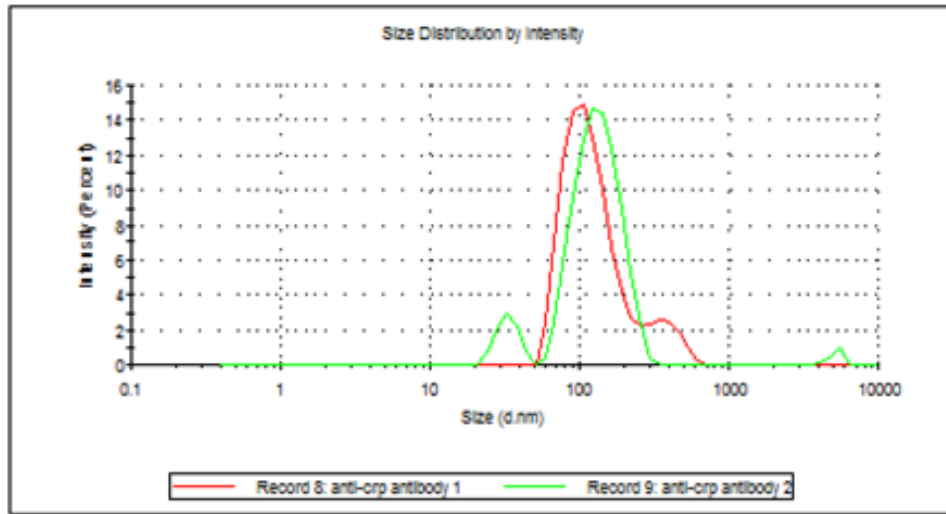
Nano-anti-CRP antibadının boyut analizi için; Nano Series (Nano-ZS) Malvern Instrument cihazı kullanılmıştır. 1000 ppm 1 mL olacak şekilde hazırlanmış nanopartiküller deiyonize su içerisinde disperse edilmiş ve ardından homojenizasyon için ultrasonik banyoda homojenize edilerek boyut ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Elde edilen analiz sonucuna göre; partiküllerin ortalama boyutu 109,6 nm ve ölçülen PDI değeri ise 0,300 olarak bulunmuştur.

Temperature (°C): 25,0                      Duration Used (s): 170  
 Count Rate (kcps): 44,0                    Measurement Position (mm): 4,65  
 Cell Description: Disposable sizing cuvette                    Attenuator: 11

### Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d....
<b>Z-Average (d.nm): 109,6</b>	<b>Peak 1: 137,9</b>	<b>89,5</b>	<b>45,44</b>
<b>Pdi: 0,300</b>	<b>Peak 2: 33,14</b>	<b>8,9</b>	<b>5,341</b>
<b>Intercept: 0,885</b>	<b>Peak 3: 5185</b>	<b>1,6</b>	<b>482,9</b>

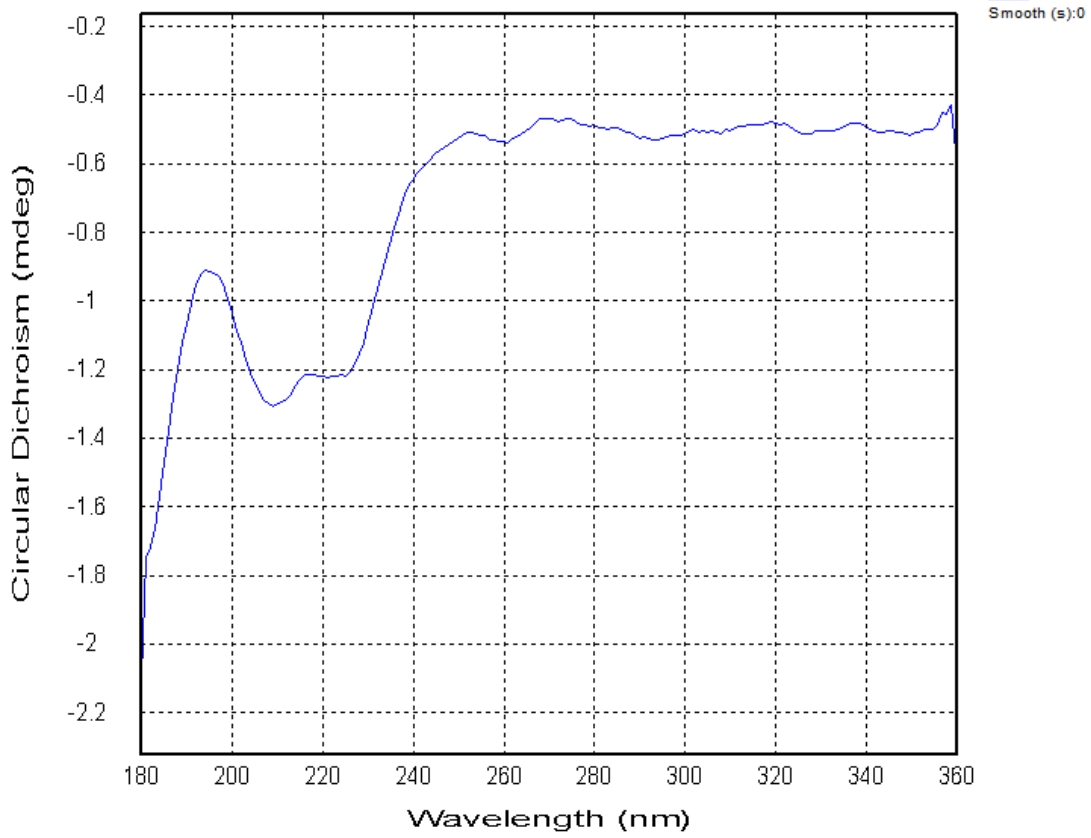
**Result                    Good**



Şekil 4.6. Nano-anti-CRP antibadının zeta boyut spektrumu

Yapılan diğer karakterizasyon işlemi de CD spektroskopisidir. Nano-anti-CRP antibadının ikincil yapısındaki değişiklikleri belirlemek için yapılmıştır. Şekil 4.7'de görülen CD spektrumunda 180-200 nm tepe noktalarıdır. 220-360 nm arasındaki tepe noktaları çapraz bağlama aşamasında nano-anti-CRP antibadiye bağlı rutenyum bazlı aminoasit monomerinin aromatik gruplarını göstermiştir.

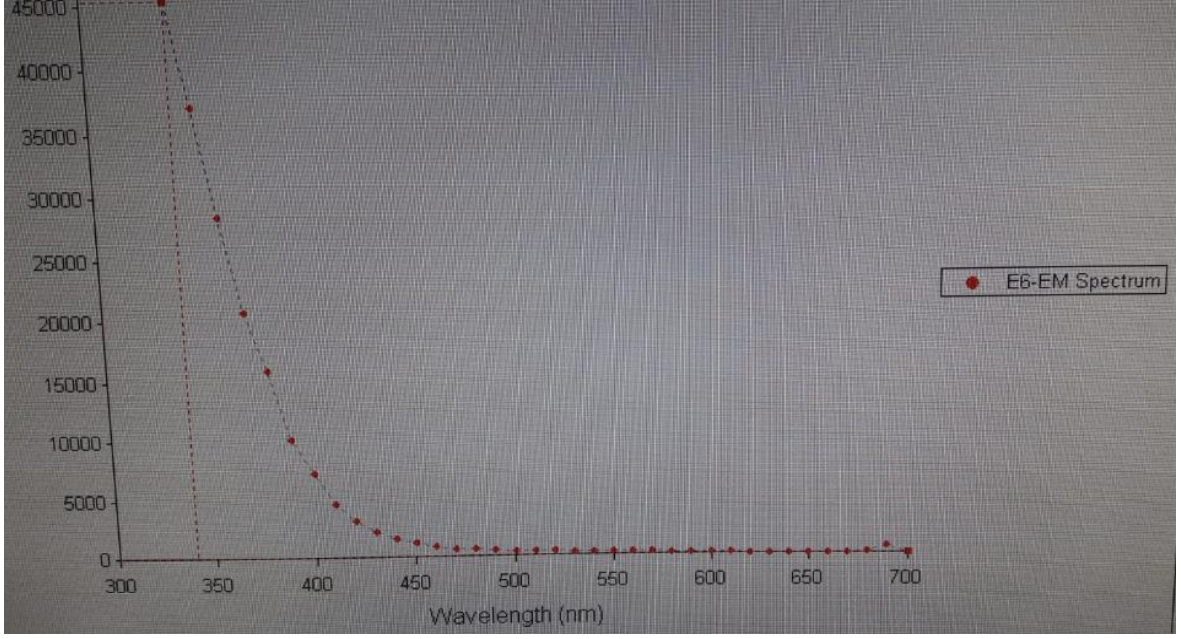




Şekil 4.7. Nano-anti-CRP antibadının CD spektrumu

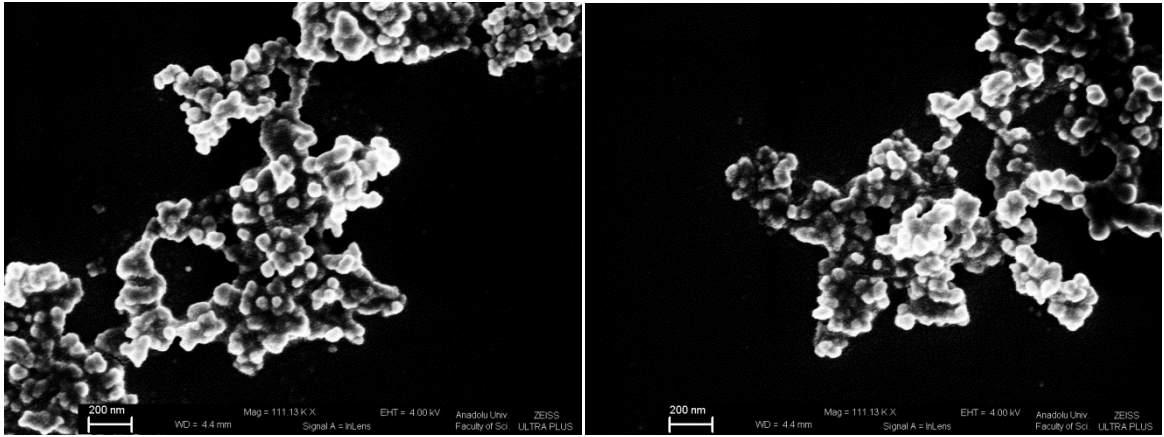
#### 4.1.5. Anti-C reaktif protein antibadi konjuge grafen oksit karakterizasyonu

Sentezlenen anti-CRP-antibadi-GFOX floresans spektrumunu için Hybrid Biotek mikropşaka okuyucu cihazı kullanılmıştır. Sentezlenen anti-CRP-antibadi-GFOX, 1000 ppm' de 1 mL nanopartikül saf su ile 3 mL'ye seyreltilmiştir. 300 nm uyarma dalga boyu ile floresans spektrumu, 320-700 nm aralığında taramayla elde edilmiştir. Şekil 4.8.' de görüldüğü üzere, anti-CRP-antibadi-GFOX floresans spektrumunda en yüksek pik 690 nm'de alınmıştır.



Şekil 4.8. Anti-CRP- antibadi GFOX floresans spektrumu

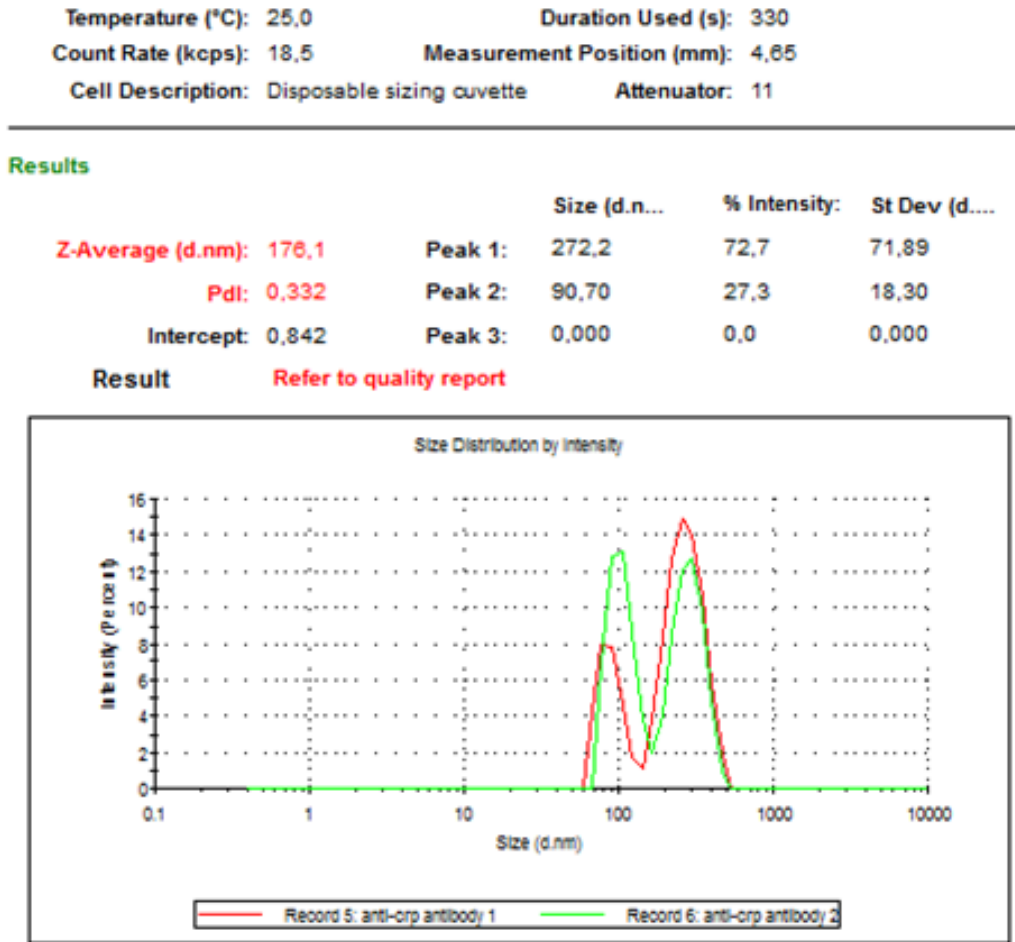
Anti-CRP-antibadi-GFOX taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleri alınarak nanopartiküllerin yapısındaki boyut dağılımı hakkında bilgi edinilmiştir. Şekil 4.9’ da elde edilen görüntüler incelendiğinde nanopartiküllerin boyutlarının ortalama 200 nm civarında olduğu görülmektedir.



Şekil 4.9. Anti-CRP-antibadi-GFOX SEM görüntüleri

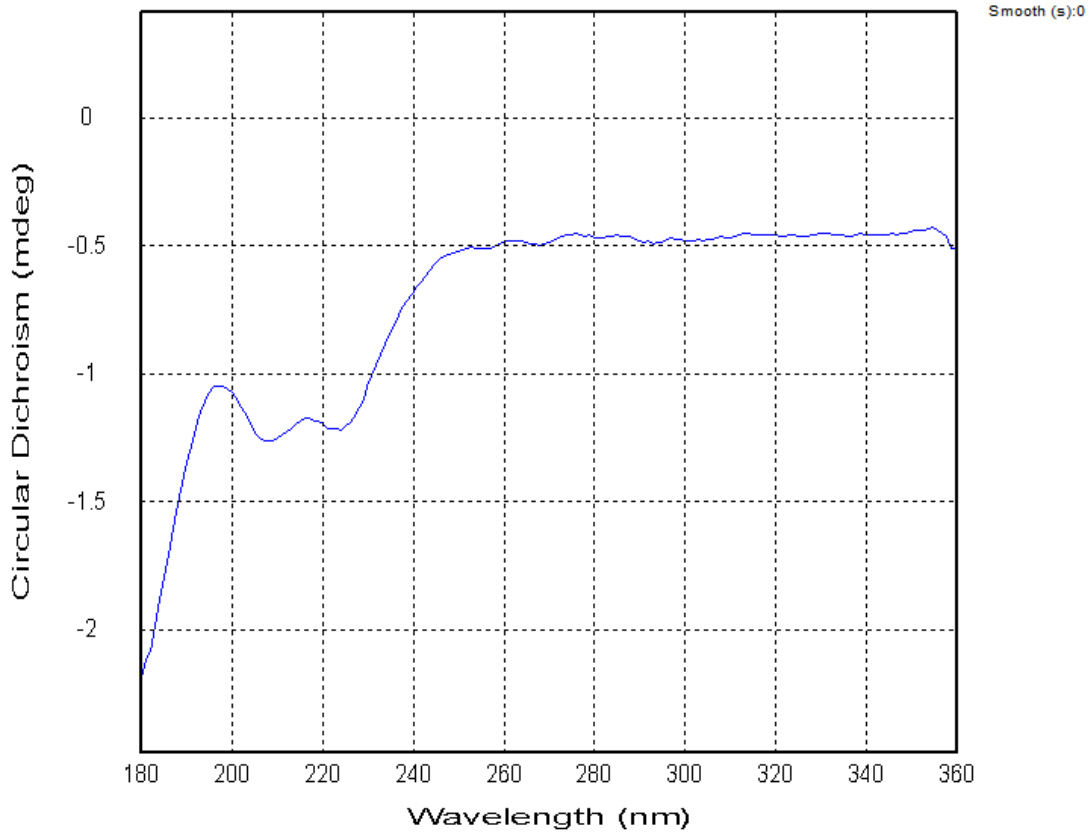
Anti-CRP-antibadi-GFOX’ un boyut analizi için; Nano Series (Nano-ZS) Malvern Instrument cihazı kullanılmıştır. 1000 ppm 1 mL olacak şekilde hazırlanmış nanopartiküller deiyonize su içerisinde disperse edilmiş ve ardından homojenizasyon için ultrasonik banyoda homojenize edilerek boyut ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen

sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmektedir. Elde edilen analiz sonucuna göre; partiküllerin ortalama boyutu 176,1 nm ve ölçülen PDI değeri ise 0,332 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10. Anti-CRP-antibadi-GFOX zeta boyut spektrumu

Anti-CRP-antibadi-GFOX' un ikincil yapısındaki değişiklikleri belirlemek için CD spektroskopisi analizi yapılmıştır. Şekil 4.11'de görülen CD spektrumunda 180-200 nm tepe noktalarıdır. 240-360 nm arasındaki tepe noktaları çapraz bağlama aşamasında nano-anti-CRP antibadiye bağlı rutenyum bazlı aminoasit monomerinin aromatik gruplarını göstermiştir.



Şekil 4.11. Anti-CRP-antibadi-GFOX CD spektrumu

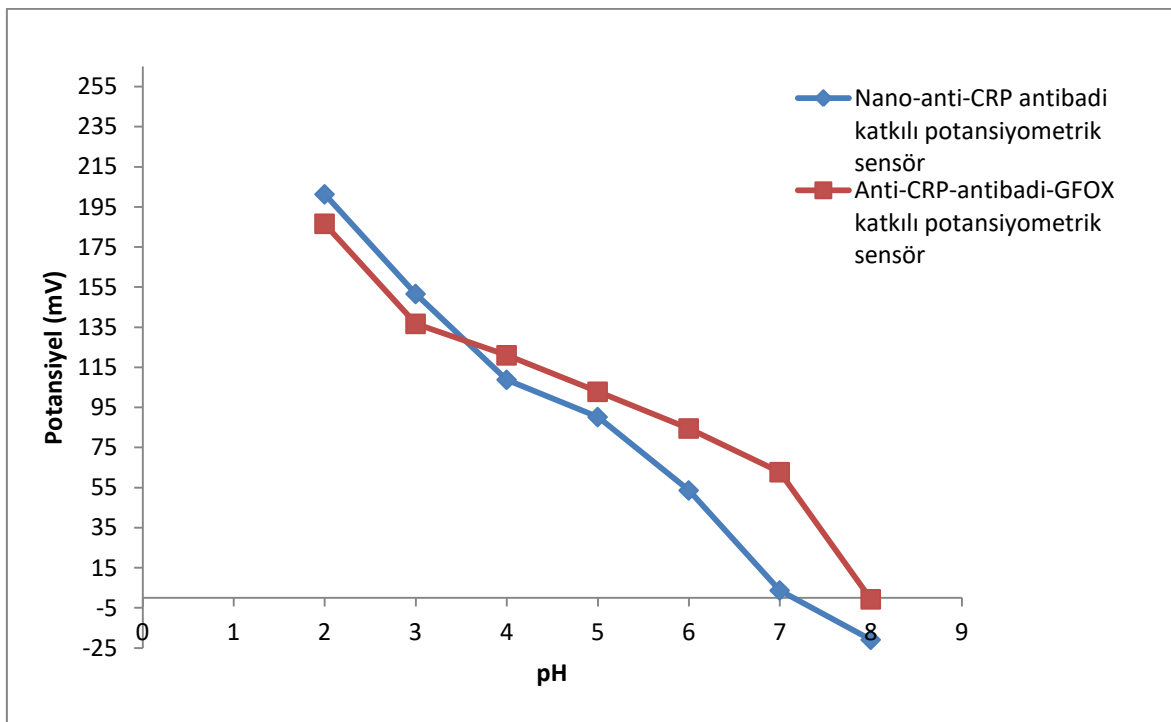
## 4.2. Potansiyometrik Sensör İle Yapılan Ölçümler

### 4.2.1. Potansiyometrik sensör için şartlandırma yapılması

Potansiyometrik ölçümlerin optimum sürede tamamlanması için ölçüm standartlarını belirlemek amacıyla ölçümün gerçekleştirilmesi gereken süreyi, rejenerasyon için gerekli süreyi ve sensörün dengeye gelmesi için gerekli süreyi belirlemek amacıyla şartlandırma basamakları çalışılmıştır. Bu amaçla;  $10^{-3}$  mM sarkozin çözeltisi, 0,1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ve 0,1 M KCl çözeltileri kullanılmıştır. Her potansiyometrik sensör için; sırasıyla  $10^{-3}$  mM sarkozin çözeltisi, 0,1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ve 0,1 M KCl çözeltisinde 1'er saat ölçümler alınmıştır ve iki kez tekrar edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan üç potansiyometrik sensör için alınacak ölçüm süresi 45 dakika olarak bulunmuştur.

#### 4.2.2. pH' ın etkisi

Potansiyometrik sensörlerin potansiyel yanıtı üzerindeki pH etkisini incelemek için 5mL  $1 \times 10^{-4}$  mM sarkozin çözeltisinin pH' ı farklı derişimlerdeki HNO<sub>3</sub> ve NaOH çözeltileriyle farklı pH değerlerine (pH: 2,0- 8,0) ayarlanmış olup her pH için 45 dk' lık ölçümler alınmıştır. Her ölçümden sonra sensör 45 dk 0,1 M asetik asit ve 1 M KCl ile muamele edilmiştir. Ölçümler, Toledo Seven Multi pH/iyonmetre ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Potansiyometrik sensörün pH etkisi şekil 4.12' de verilmiştir.



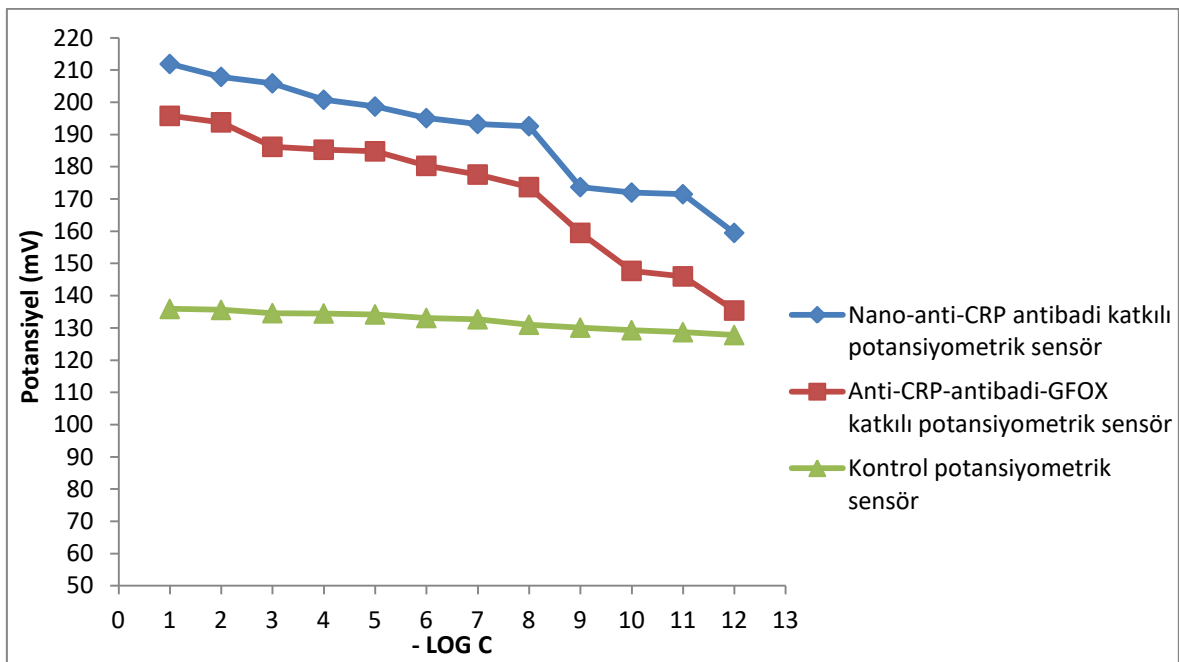
Şekil 4.12. Potansiyometrik sensöre pH etkisi ( C:  $1,0 \times 10^{-4}$  mM sarkozin, T: 25<sup>0</sup>C)

Şekil 4.12.' de görüldüğü üzere pH, iki potansiyometrik sensörde de potansiyel pH 2,0' de maksimum değere ulaşmıştır. İki potansiyometrik sensörün de asidik ortamda ( pH 2,0) daha kararlı olduğu gözlenmiştir.

#### 4.2.3. Derişimin etkisi

Nano-anti-CRP antibadi katkıli potansiyometrik sensör, anti-CRP-antibadi-GFOX katkıli potansiyometrik sensör ve kontrol potansiyometrik sensör farklı konsantrasyonlarda ( $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-12}$  mM) 5 mL sarkozin çözeltileriyle muamele edilmiştir. Düşük

konsantrasyondan yüksek konsantrasyona olacak biçimde hazırlanmış sarkozin çözeltilerinde (nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör, anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensör ve kontrol potansiyometrik sensör) 45dk'lık ölçümler oda sıcaklığında alınmıştır. Her ölçümden sonra elektrot yaklaşık 45 dk 0,1 M asetik asit ve 1 M KCl ile muamele edilmiştir. Ölçümler, belirlenen optimum pH:2 değerinde ve üç potansiyometrik sensör için de aynı biçimde gerçekleştirilmiştir. Potansiyel değişimleri MetlerToledo Seven Multi pH/iyonmetre ile bulunmuştur. Cihazda ölçülen ölçümler konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir.



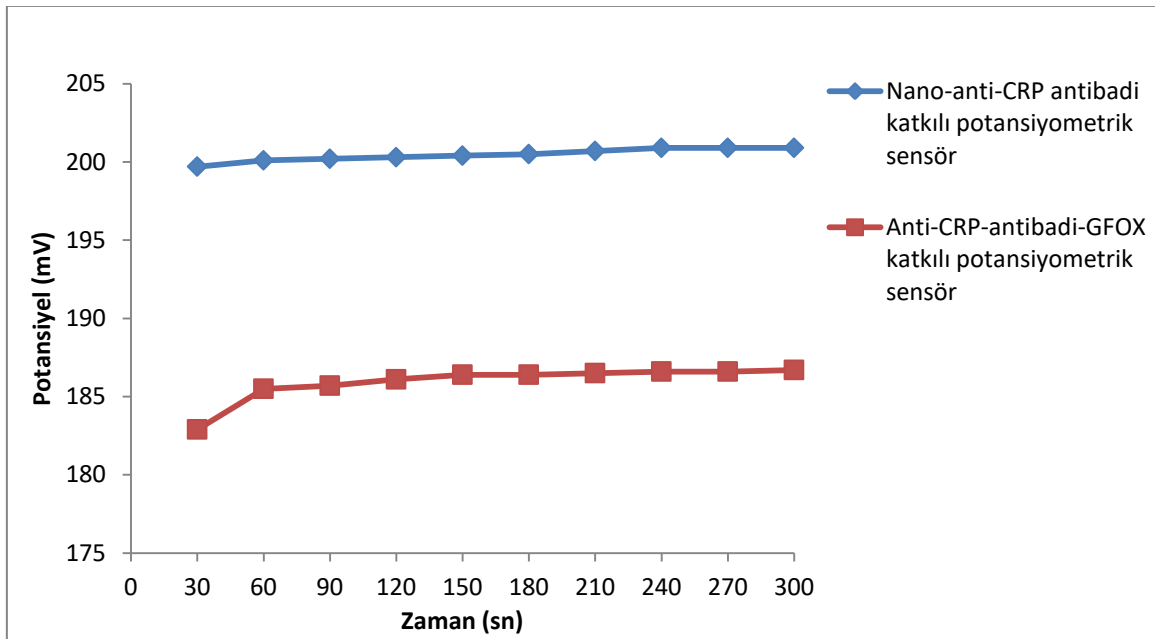
Şekil 4.13. Potansiyometrik sensörlere sarkozin konsantrasyonunun etkisi ( pH:2,0; C:  $1,0 \times 10^{-1}$  -  $1,0 \times 10^{-12}$  mM ; T: 25  $^{\circ}$ C)

Şekil 4.13' de gösterdiği gibi nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör, anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensöre göre daha yüksek potansiyelde tepki verdiği gözlenmiştir. En düşük potansiyel değeri ise kontrol potansiyometrik sensöründe gözlemlenirken, artan derişimin kontrol potansiyometrik sensörünün potansiyeli üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

#### 4.2.4. Cevap süresinin belirlenmesi

Potansiyometrik sensörlerin referans elektrotta karşı belirli konsantrasyonlardaki sarkozin çözeltilerinin potansiyelleri farklı zaman dilimlerinde ölçülüp elektrodun cevap süresi bulunmuştur. Potansiyelin kararlı hale gelmesi için, gerekli olan süre kaydedilmiştir. Potansiyel ölçümlerinin kararlı hale geldiği süre potansiyometrik sensörün cevap süresi olarak bulunmuştur.

Potansiyometrik sensörün algılama yeteneğini ölçen bir diğer önemli faktör cevap süresinin belirlenmesidir. Cevap süresi, polimerli potansiyometrik sensörlerin referans elektroda karşı  $1,0 \times 10^{-4}$  mM sarkozin çözeltisiyle sensörlerin zamana karşı potansiyometrik davranışı incelenmiştir (Şekil 4.14). Bir sensörün analitik çalışmalar için verimli bir biçimde kullanılmasında cevap süresinin kısa olması gerekir.



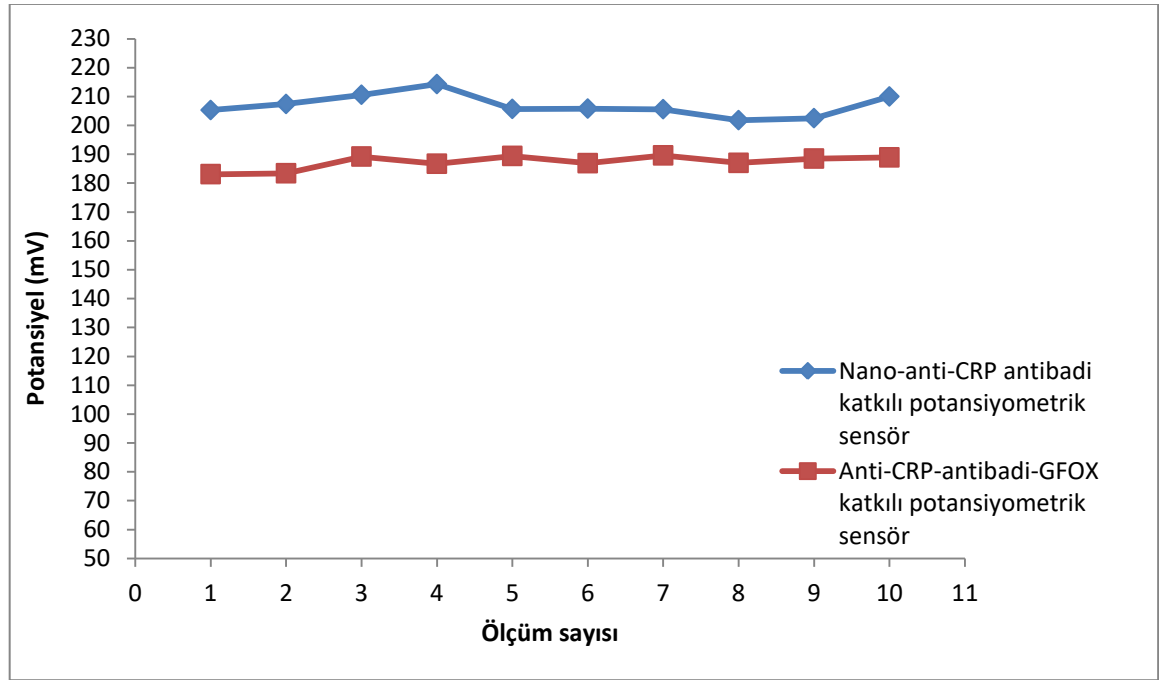
Şekil 4.14. Potansiyometrik sensörlerin cevap zamanı ( pH: 2,0 ; C:  $1,0 \times 10^{-4}$  mM, T:25<sup>0</sup>C)

Şekil 4.14' de gösterildiği gibi,  $1,0 \times 10^{-4}$  mM nano-anti-CRP katkıli potansiyometrik sensörün 60 saniye ve anti-CRP-GFOX katkıli potansiyometrik sensörün ise yaklaşık 120 saniyede karara geldiği belirlenmiştir.

#### 4.2.5. Tekrar kullanılabilirlik ve ömrünün belirlenmesi

Potansiyometrik sensörlerin önemli kriterlerden biri olan tekrar kullanılabilirliğin belirlenmesi için aynı derişimdeki sarkozin çözeltilerinin potansiyeli ölçülüp her ölçümden sonra referans ve indikatör elektrot deiyonize suyla yıkanmıştır ve diğer ölçüm alınmıştır. Potansiyometrik sensörlerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için potansiyometrik ölçüm işlemi ardı ardına 10 kez yapılmıştır. Bu işlem  $10^{-3}$  mM'lık sarkozin çözeltisi ile yapılmıştır. Her kullanımdan sonra potansiyometrik sensörler 45 dk 0,1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  çözeltisi ve 1 M KCl ile muamele edilerek sensörün desorpsiyonu sağlanmıştır.

Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi iki potansiyometrik sensörün potansiyelinde kayda değer bir azalma olmamıştır. Kayıp olmadan 10'a kadar tekrar kullanılabilir çalışmalar ortaya koyulup hassasiyetinde herhangi bir kayıp tespit edilmemiştir.



Şekil 4.15. Potansiyometrik sensörlerin tekrar kullanılabilirliği (pH:2,0, C: $1,0 \times 10^{-3}$  mM sarkozin, T: $25^{\circ}\text{C}$ )

Hazırlanan polimerli potansiyometrik sensörler ve kontrol potansiyometrik sensör ile yaklaşık 3-4 ay boyunca kalibrasyon çözeltilerinin potansiyelleri okunmuş ve sensörün potansiyelinin düşmeye başladığı süre sensörün ömrü olarak belirlenmiştir. Nano-anti-CRP

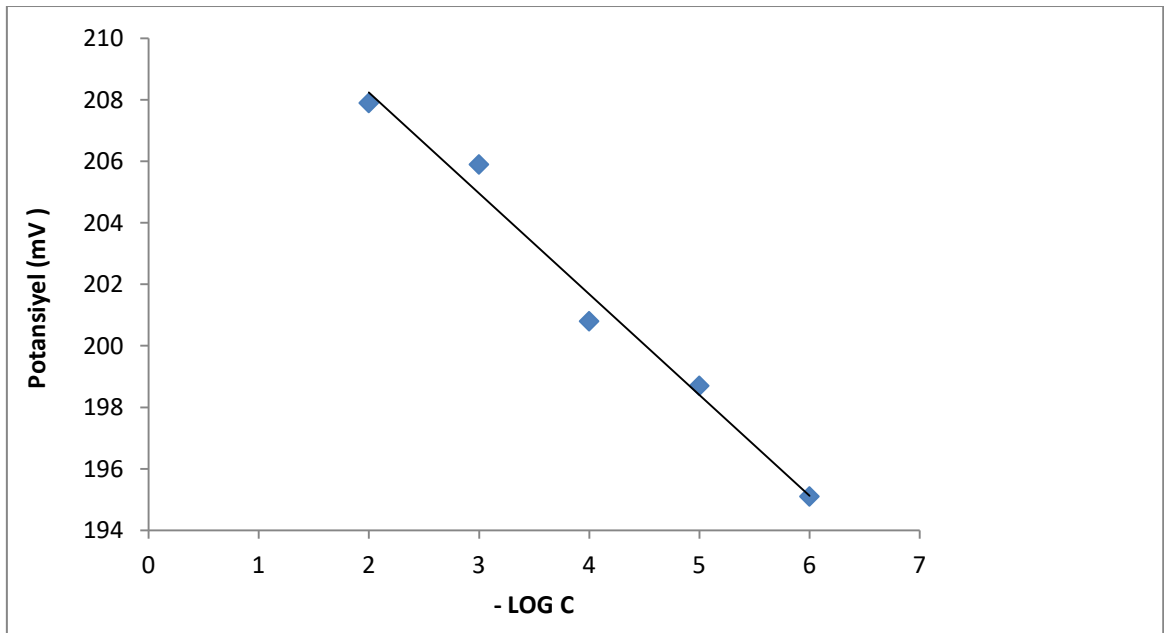


antibadi katkılı potansiyometrik sensör ve anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensör 3-4 ay süresince kararlı bir şekilde kullanılabilirler gözlenmiştir.

#### 4.2.6. Analitik performansın değerlendirilmesi

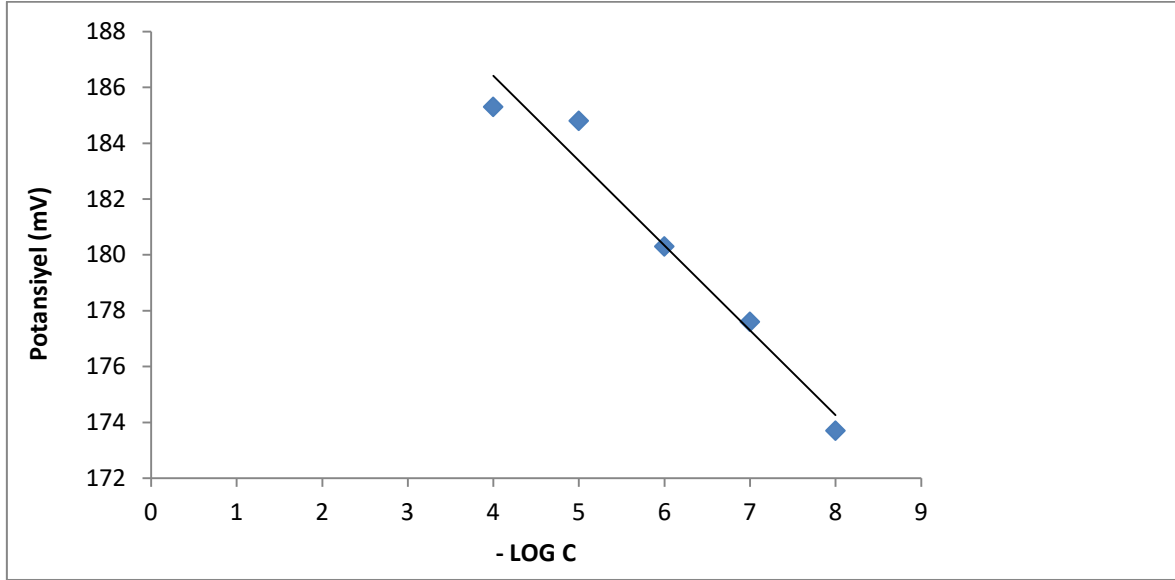
Derişimi belirli çözeltilere, potansiyometrik sensörler ve referans elektrot daldırılarak elektrokimyasal hücreler oluşturulmuştur. Hücrenin potansiyel ölçümleri,  $1,0 \times 10^{-12}$ – $1,0 \times 10^{-1}$  mM derişim aralığında hazırlanan sarkozin çözeltilerin düşük derişimden yüksek derişime olacak şekilde ( nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör, anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensör ) 45 dk' lık ölçümler oda sıcaklığında alınmıştır. Her bir çözeltiler için okunan hücre potansiyeli, çözeltilerin derişimine karşı grafiğe geçirilerek, potansiyometrik sensörlerin kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisinden doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilir sınırlar tespit edilmiştir.

Nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensörün tayin limiti  $4,75 \times 10^{-9}$  mM olarak elde edilmiştir ve sensörün, doğrusal çalışma aralığı  $1,0 \times 10^{-6}$  ile  $1,0 \times 10^{-2}$  mM konsantrasyon aralığında olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensörün doğrusal çalışma aralığı ( pH:2, 25°C)

Anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensörün tayin limiti  $3.34 \times 10^{-9}$  mM olarak elde edilmiştir ve sensörün, doğrusal çalışma aralığı  $1,0 \times 10^{-8}$  ile  $1,0 \times 10^{-4}$  mM konsantrasyon aralığında olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensörün doğrusal çalışma aralığı (pH:2, 25°C)

Çizelge 4.1. Potansiyometrik sensörlerin tayin limitinin literatür ile karşılaştırılması

Çalışma	Tayin limiti
Bu çalışmada, nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör	$4.75 \times 10^{-9}$ mM
Bu çalışmada, anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensör	$3.34 \times 10^{-9}$ mM
Rebelo vd., 2014, elektrokimyasal bir enzimatik biyosensör	$16 \times 10^{-6}$ mM
Diltemiz S. ve Uslu O., 2015, reflükometrik girişim spektroskopisi nanosensörleri	$45 \times 10^{-6}$ mM
Özkütük vd., 2016, moleküler baskılı polimer baskılı sensör	$1.35 \times 10^{-7}$ mM
Nguy vd., 2017, biyomimetik sensör	$8,5 \times 10^{-6}$ mM

Çizelge 4.1' de görüldüğü gibi her iki potansiyometrik sensör de literatüre üstünlük sağlamıştır. Nanopartiküller, elektrotlara modifiye edildikleri zaman elektron aktarım hızında artış sağlayarak daha düşük tayin limitine inilmesine olanak sağlamaktadır. Anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensör ve nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör nanopartikül etkisi görülmüş ve literatüre üstünlük sağlamıştır.

#### 4.2.7. Seçicilik çalışması

Polimerli potansiyometrik sensörün, çeşitli iyonlarla etkileşebileceği ve bu iyonların sensörün performansını etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu sebeple, sensörün moleküler olarak benzerlik gösteren glisin aminoasidine karşı seçiciliği belirlenmiştir. Söz konusu iyonun (glisin) polimerli potansiyometrik sensörlerin cevabına etkisini belirlemek ve seçicilik katsayısını tayin etmek için Fixed metodu kullanılmıştır ( Umezawa, et al., 1995).

Fixed (sabit girişim) metodu; potansiyometrik sensör ve referans elektrottan meydana gelen hücrenin potansiyeli bozucu etki yapan glisin konsantrasyonunun ( $10^{-3}$  mM) sabit olduğu fakat ana iyon sarkozin konsantrasyonunun ( $10^{-2}$  mM –  $10^{-12}$  mM ) değiştiği çözeltiler ile (2,5ml glisin + 2,5 ml sarkozin çözeltisi) 5ml hacimde ölçülmektedir. Okunan potansiyel değerlerine karşı sarkozin konsantrasyonunun -log karşı grafiğe yerleştirilir. Grafiğin doğrusal kısımlarının ekstrapolasyonu ile elde edilen kesim noktasından bulunan değerden yararlanılarak seçicilik katsayıları bulunmuştur. Nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör ve anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensör için çeşitli yöntemlerle yapılan hesaplamalar sonucu bulunan seçicilik katsayıları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Potansiyometrik sensörlerin seçicilik çalışması

	Nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör			Anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensör		
Ölçülen değerler	$10^{-2}$ – $10^{-12}$ mM sarkozin çözeltileri	$10^{-2}$ – $10^{-12}$ mM glisin çözeltileri	$10^{-3}$ mM glisin + $10^{-2}$ – $10^{-12}$ mM sarkozin çözeltisi	$10^{-2}$ – $10^{-12}$ mM sarkozin çözeltileri	$10^{-2}$ – $10^{-12}$ mM glisin çözeltileri	$10^{-3}$ mM glisin + $10^{-2}$ – $10^{-12}$ mM sarkozin çözeltisi
	207,9mV	188,0mV	199,9mV	195,8mV	163,8mV	190,1mV
	205,9mV	186,7mV	193,0mV	193,8mV	162,9mV	189,8mV
	200,8mV	185,7mV	192,2mV	186,2mV	158,8mV	189,5mV
	198,7mV	184,2mV	187,8mV	185,3mV	158,0mV	187,4mV
	195,1mV	176,9mV	181,1mV	184,8mV	156,3mV	186,4mV
	193,3mV	172,5mV	178,3mV	180,3mV	155,8mV	178,9mV
	192,6mV	169,0mV	176,7mV	177,6mV	135,1mV	171,1mV
	173,7mV	168,9mV	176,3mV	173,7mV	132,7mV	162,6mV
	172,0mV	159,9mV	174,9mV	159,5mV	126,9mV	143,4mV
	171,5mV	158,9mV	173,8mV	147,7mV	119,9mV	137,9mV
159,5mV	158,6mV	134,4mV	146,0mV	115,2mV	124,6mV	
Fixed metodu	2.58			2.49		

Çizelge 4.2’ deki ölçülen değerler incelendiğinde 45 dakika boyunca sensörün tepkisi izlenmiştir. Aynı derişimlerde hazırlanan sarkozin ve glisin çözeltilerine ait potansiyel değerlerinden görüleceği üzere, glisin için potansiyometrik sensörler zaman içerisinde stabil olmamış sarkozine kıyasla çok daha düşük mV değerinde tepki vererek potansiyometrik sensörün sarkozin için seçici özellikte olduğunu göstermiştir. Ölçülen değerlerden elde edilen grafikler sonucunda her iki potansiyometrik sensörün de hesaplanan seçicilik katsayılarına göre, potansiyometrik sensörlerin hedef moleküle (sarkozin) karşı daha seçici olduğu gözlenmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sarkozin konsantrasyonunun kan serumu ve idrarda artış göstermesi, prostat kanserinin erken dönemde tespiti için biyolojik örneklerde sarkozinin belirlenmesinin önemi büyüktür. Bu sebeple, sarkozinin tayin edilmesi önemli olmaktadır. Sarkozinin tayin edilmesi için, çeşitli yöntemler ile yapılan birçok çalışma vardır. Ama bu yöntemler; rutin analiz için uygun olmayan yüksek alet ve malzeme maliyetleri, karmaşık numune hazırlama ve vasıflı operatör gereksinimi, etkinlik ve manipülasyon açısından pratik sınırlamaları olduğu bulunmaktadır. Bu olumsuzluklar, yeni yöntemlerin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu yöntemlerden biri de, potansiyometrik sensördür. Çalışmamızda, sarkozine karşı yüksek spesifikliğe sahip olan nano-anti-CRP antibadi ve anti-CRP-antibadi-GFOX ile hazırlanan potansiyometrik sensörlerin potansiyometrik davranışları incelenmiştir.

Bu amaçla; ANADOLUCA yöntemi kullanılarak nano-anti-CRP antibadi ve anti-CRP-antibadi-GFOX sentezlenmiştir. Mikroemülsiyon polimerizasyon tekniğine dayanan bu yöntem biyomolekülleri rutenyum şelatlarıyla (MATyr-Ru(bipyr)<sub>2</sub>-MATyr) çapraz bağlamaktadır. Mikroemülsiyon polimerizasyon ortamı, PVA' nın saf su içerisinde dağılmasıyla oluşturulmuş olup, reaksiyon azot atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen nano-anti-CRP antibadi ve anti-CRP-antibadi-GFOX, bu yöntemin fiziksel ve kimyasal kararlılığıyla güçlendirilmiştir, böylece moleküllerin faaliyetlerinde kayıp olmadan tekrar kullanılmasına imkan sunmaktadır.

Nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör ve anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensör ile ardı ardına 10 kez tekrardan sonra bile sensörlerin potansiyometrik davranışında herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör ve anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensör 3-4 ay süresince kararlı bir şekilde kullanılabilirler gözlenmiştir.

ANADOLUCA yönteminin en önemli avantajı; sentezlenen nano-anti-CRP antibadi ve anti-CRP-antibadi-GFOX kullanılan antibadilerin bağlanmasında işlevselliğini korumasını sağlamasıdır. Bu, antibadilerin yapısında ciddi bozulmalar yaratmaması

gerektiği anlamına gelir. Böylece; antibadinin konformasyonu ve fonksiyonunu etkilemeden, pH ve sıcaklıktan bağımsız olarak yumuşak koşullarda gerçekleştirilmektedir. Nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör, anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensörün pH yanıt profili incelenip her iki potansiyometrik sensörün pH 2,0'de maksimum potansiyel gösterdiği gözlenmiştir. Potansiyometrik sensörlerin pH 2,0'de etkinlik göstermesi, ANADOLUCA yöntemine göre sentezlenen antibadilerin daha düşük pH değerinde bozunmamasına olanak sağlamaktadır.

Nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör, anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensör ve kontrol karbon pasta potansiyometrik sensör olmak üzere üç farklı karbon pasta elektrot hazırlanmıştır. Karbon pasta elektrotlar, kolay bir şekilde yenilenebilen ve modifiye edilebilen bir yüzeye sahiptir. Maliyeti düşük, yapımları ve yenilenmesi basit ve süresi kısa olup çok düşük zemin akımı gösterirler. Karbon pasta elektrotların yapılarında bulunan elektrolitik madde olan grafit tozu nedeniyle herhangi bir ön işleme gerek duymadan kolaylık ile hazırlanmaktadır ve işlemler için kullanıma uygun hale getirilmektedir. Ayrıca, bu elektrotların bileşiklerini ve oranlarını araştırmacı kendisi seçebildiği için laboratuvar ortamında karıştırılıp hazırlanması avantajlıdır.

Nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör ve anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensörün tayin limitleri literatür ile kıyaslandığında daha düşük bulunmuştur. Potansiyometrik sensör yapımında kullanılan nanopartiküller yapıya hassasiyet, elektriksel iletkenlik ve direnç sağlamıştır. Kullanılan grafen oksidin yüksek esnekliği, mekanik mukavemeti, termal iletkenlik, yüksek elektriksel iletkenlik, kolay hazırlanabilmesi ve işlenirlebilirliğinden dolayı tercih edilmektedir. Potansiyometrik sensörlerin elektron aktarım hızlarının artmasından dolayı daha düşük tayin limitlerine inilmesine olanak sağlamıştır.

Potansiyometrik sensörlerin analitik çalışmalarda verimli bir şekilde kullanılması için cevap süresinin kısa olması gerekmektedir. Nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör, 60 saniye gibi kısa bir sürede karara geldiği, anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensörün ise, 120 saniye gibi kısa bir sürede karara geldiği tespit edilmiştir.

Seçiciliği incelemek için; glisinin, nano-anti-CRP antibadi katkılı potansiyometrik sensör ve anti-CRP-antibadi-GFOX katkılı potansiyometrik sensörlerin cevabına etkilerini belirleyebilmek ve seçicilik katsayısını hesaplayabilmek için, Fixed metodu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, her iki potansiyometrik sensörün de seçicilik katsayısı 2,50 civarında olduğu belirlenmiştir. Her iki potansiyometrik sensörün de hedef iyona (sarkozin) daha seçici olduğunu göstermektedir.

Kullanılan potansiyometrik yöntem, her laboratuarda bulunabilecek basit bir pH metre ile ölçüm alınabilen basit ve ucuz alet kullanılmasından dolayı oldukça ekonomik bir yöntemdir. Ayrıca; hazırlanan potansiyometrik sensörler, sarkozin tayini için yüksek hassasiyete sahip, hazırlanması ve prosedürü kolay, düşük maliyetli, çok düşük derişimlere inebilen bir yöntem imkanı sağlamıştır. Bu bulgular neticesinde, prostat kanseri biyobelirteci sarkozinin tayin etmek için, kullanılan potansiyometrik sensörlerin etkin analizinden dolayı prostat kanserinin erken teşhis sağlanacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akşit, F., Akgün, Y., Kiraz, N., 1996. Mikrobiyoloji. Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir
- Amaral, L.M.P.F., Santos, F.L.O.M., Silva, M.M.C., Notario, R., 2012, Thermochemistry of sarcosine and sarcosine anhydride: theoretical and experimental studies, J. Chem. Thermodynamics, 315.
- Amemiya, S., Buhlmann, P., Umewaza, Y., 1998, A phase boundary potential model for apparently “Twice-Nernstian” responses of liquid membrane ion-selective electrodes, Analytical Chemistry 70(3), 445-454.
- Anonim, 2016, <http://akimya.pharmacy.ankara.edu.tr/wpcontent/uploads/sites/43/2016/10/potansiyometri.pdf>, erişim tarihi: 31.01.2019
- Anonim, 2018, <https://en.wikipedia.org/wiki/Sarcosine>, erişim tarihi: 29.12.2018
- Anonim, 2018, [www.selcuk.edu.tr/dosyalar/files/074/Sensörler\\_Ve\\_Transduserler.pdf](http://www.selcuk.edu.tr/dosyalar/files/074/Sensörler_Ve_Transduserler.pdf), erişim tarihi: 29.12.2018.
- Anonim, 2018, [www.yildiz.edu.tr/~sandalci/dersnotu/alg/1sensors.pdf](http://www.yildiz.edu.tr/~sandalci/dersnotu/alg/1sensors.pdf), erişim tarihi: 29.12.2018.
- Arslan, B.A., 2017, Antikanser ilaç etken madde olan busulfan seçici potansiyometrik sensörün geliştirilmesi, Yüksek lisans tezi, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-47.
- Basu, S., Bhattacharyya, P., 2012, Recent developments on graphene and graphene oxide based solid state gas sensors, Sens. Actuators B. Chem. 173,1–21.
- Bektaşoğlu, E., 2011, Ligand değişimine dayanan dimetoat baskılı polimerlerin katı faz ekstraksiyonu ve potansiyometrik sensör uygulamaları, Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 45-54.
- Biavardi, E., Tudisco, C., Maffei, F., Motta, A., Massera, C., et.al., 2012, Exclusive recognition of sarcosine in water and urine by a cavitand-functionalized silicon surface, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 2263–2268.
- Bingöl, G., 1972, Proteinler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 30, s.4-10.
- Birinci, A., 2016, Risperidon bileşiğine duyarlı potansiyometrik sensör geliştirilmesi, Yüksek lisans tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-47.
- Buck, P.D., Lindner, E., 1994, IUPAC Analytical Chemistry Division, Commission on Electroanalytical Chemistry, Recommendations for nomenclature of Ion-selective Electrodes, Pure Appl. Chem. 66, 2527-2536.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Burton,C., Gamagedara, S., Ma, Y.,2012, A novel enzymatic technique for determination of sarcosine in urine samples, *Anal. Methods* 4, 141–146.
- Cernei, N., Zitka, O., Ryvolova, M., Adam, V., Masarik, M., et.al., 2012, Spectrometric and electrochemical analysis of sarcosine as a potential prostate carninoa marker, *Int. J. Electrochem. Sci.* 7, 4286-4301.
- Couzin, J., 2009, Metabolite in urine may point to high-risk prostate cancer, *Science*.
- Covington, A.K., 1974, Ion-selective electrodes, *Analytical Chemistry*, 335-406.
- Çelik, N.Y., 2017, Antihipertansif ilaç etken madde olan atenolole seçici potansiyometrik sensörün geliştirilmesi, Yüksek lisans tezi, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-50.
- Çiftçi, N.S., 2015, İndirgenmiş grafen okside desteklenmiş nikel-paladyum alaşım nanopartikülleri: sentezi, yapısal tanımlanmaları ve amonyak boran' dan hidrojen üretiminde katalitik etkinlikleri, Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 40-42.
- Dalkıran, B., 2009, Lariat crown bileşiğinin iyonofor olarak kullanıldığı cıva(II) iyon-seçici elektrot geliştirilmesi, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-81.
- Diltemiz, S.E., Uslu, O., 2015, A Reflectometric Interferometric Nanosensor for Sarcosine, *Biotechnol. Prog.* 31, 55-61.
- Dotd, G., Kim, D.G., Reimann, S.A., Reuber. B.E., McCabe. K., et.al., 2000, L-pipecolic acid oxidase, a human enzyme essential for the degradation of L-pipecolic acid, is most similar to the monomeric sarcosine oxidases, *Biochem J* 345, 487–494.
- Dreyer, D.R., Park, S., Bielawski, C.W., Ruoff, R.S., 2010, The chemistry of graphene oxide, *Chem. Soc. Rev.* 39, 228-240.
- Du, H., Li, J., Zhang, J., Su, G., Li, X., et.al., 2011, Separation of hydrogen and nitrogen gases with porous graphene membrane, *J. Phys. Chem. C.* 115, 23261-23266.
- Durgun, Ö., 2013, Katı-kontakt iyon seçici membran elektrotların hazırlanması ve membran bileşiminin elektrotların performanslarına etkilerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ekinci, M.B., [https://abs.mehmetakif.edu.tr/upload/1127\\_908\\_dosya.pdf](https://abs.mehmetakif.edu.tr/upload/1127_908_dosya.pdf), erişim tarihi: 29.12.2018.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eren, H., 2006, Bütünüyle katı-hal PVC membran ve kompozit  $\text{NO}^-_3$ -seçici potansiyometrik sensörler ve uygulamaları, Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-119.
- Ersöz, A., Hur, D., Yılmaz, F., Denizli, A., Özcan, A., et.al., 2011, Photosensitive aminoacid-monomer linkage and bioconjugation applications in life sciences and biotechnology, US 2011/031 1505 A1 ,1-7.
- Gündüz, T., 2002, İnrümental analiz, Gazi Kitapevi, 10. Baskı, 1355
- Güre, R., 2005, Düşük sıcaklık amonyak gaz sensörlerinin geliştirilmesi ve uygulamaları, Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, 73.
- Hakan, A.K., 2013, Glisin, triptofan, lösin, ve fenilalanin amino asitlerinin Co (II), Ni (II), Cu (II) ve Zn (II) geçiş metalleri ile komplekslerin sentezi, yapısal karakterizasyonu ve biyolojik uygulamaları, Yüksek lisans tezi, Hitit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 3-4.
- Heger, Z., Cernei, N., Krizkova, S., Masarik, M., Kopel, P., et.al., 2015, Paramagnetic nanoparticles as a platform for FRET-based sarcosine picomolar detection, Scientific Reports 5: 8868, 1-7.
- İbaoğlu, K., Önal, A., 2004, Aminoasitler, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları No:2, Ders Notları Serisi No:03, s.42-354.
- İbiş, O., 2018, <https://studylibr.com/doc/700749/amino-asitler>, erişim tarihi: 29.12.2018.
- Kaplan, Ö., 2007, Pb (II)-seçici PVC elektrot hazırlanması ve analitik uygulamaları, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 143.
- Karaçelik, A., 2015, Poli(metilen mavisi) kaplı altın elektrot ile asetilsalisilik asite duyarlı potansiyometrik sensör geliştirilmesi, Yüksek lisans tezi, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-73.
- Kavaz, D., 2011, Nanopartiküller, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bilim Dergisi, Mayıs 2011, s.12-17.
- Kerr, S.J., 1972, Competing methyltransferase systems, J Biol Chem 247, 4248-4252.
- Keskin, H., 1987, Besin kimyası, Güryay Matbaacılık.
- Khan, A.P., Rajendiran, T.M., Ateeq, B., Asangani, I.A., Yocum, A.K., et.al., 2013, The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression, 492-493.
- Kim, J., Cote, L.J., Huang, J.X., 2012, Two dimensional soft material: new faces of graphene oxide, Accounts Chem. Res. 45, 1356-1364.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lu, G., Park, S., Yu, K., Ruoff, R.S., Ocola, L.E., et.al., 2011, Toward practical gas sensing with highly reduced graphene oxide: a new signal processing method to circumvent run-to-run and device-to-device variations, *ACS Nano* 5, 1154–1164.
- Moein, M.M., Rehim, A.A., Rehim, M.A., 2014, On-line determination of sarcosine in biological fluids utilizing dummy molecularly imprinted polymers in microextraction by packed sorbent, *Journal of Separation Science* 38, 788-795.
- Moghaddam, H.H., Hagigatgoo, M., 2015, Nonderivatized sarcosine analysis by gas chromatography after solid-phase microextraction by newly synthesized monolithic molecularly imprinted polymer, *Chromatographia* 78, 1263-1270.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005, *Lehninger Biyokimyanın Temelleri*, Palme Yayıncılık, Ankara, s.116, 118.
- Nguy, T.P., Phi, T.V., Tram, D.T.N., Eersels, K., Wagner, P., 2017, Development of an impedimetric sensor for the label-free detection of the amino acid sarcosine with molecularly imprinted polymer receptors, *Sensors and Actuators B* 246, 461-470.
- Özakar, E., 2014, Etkin madde yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması ve in vitro değerlendirilmesi, Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 27.
- Özkütük, E.B., Diltemiz, S., Avcı, Ş., Uğurağ, D., Aykanat, R., vd., 2016, Potantiometric sensor fabrication having 2D sarcosine memories and analytical features, *Materials Science and Engineering C*, 231.
- Öztoprak, U.T., 2017, Amino asitler ve yeni bir oksim ligandı ile karışık ligandlı geçiş metal komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 22-27.
- Porter, D.H., Cook, R.J., Wagner, C., 1985, Enzymatic properties of dimethylglycine dehydrogenase and sarcosine dehydrogenase from rat liver, *Arch Biochem Biophys* 243, 396–407.
- Rebelo, T.S.C.R., Pereira, C.M., Sales M.G.F., Noronha J.P., Rodrigues, J.C., et.al., 2014, Sarcosine oxidase composite screen-printed electrode for sarcosine determination in biological samples, *Analytica Chimica Acta* 850, 26-32.
- Sakallıoğlu, H., 2013, Manyetik nanopartiküller üzerine desteklenmiş schiff bazı türevi metal komplekslerinin sentezleri ve katalitik etkinliklerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 11.
- Skoog D. A., West D. M. and Holler F. J., 1990, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing, Rinehart and Winston Inc., p.460.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Skoog, D.A. Nieman, T.A., Holler, F.J., 1998, Enstrümental Analiz İlkeleri, 591-610.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., 1990, Fundamentals of Analytical Chemistry, Saunders College Publishing, Rinehart and Winston Inc., p.
- Sreekumar, A., Poisson, L.M., Rajendiran, T.M., Khan, A.P., Cao, Q., et.al., 2009, Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression, Nature, 910.
- Stetter, J.R., Penrose, W.R., 2002, Sensors Update, 10, 189.
- Tekeli, F.T., 2014, Gıda örneklerine hedefli kapiler elektroforez-lazer indüklenmiş floresans tekniği ile yeni analiz yöntemleri geliştirilmesi, Doktora tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 18-19.
- Tiyek İ., Dönmez, U., Yıldırım, B., Alma, M.H., Ersoy, M.S., vd., 2016, Kimyasal yöntem ile indirgenmiş grafen oksit sentezi ve karakterizasyonu, SAÜ Fen Bil. Der. 20, 350.
- Tunca, E.Ü., 2015, Nanoteknolojinin temeli nanopartiküller ve nanopartiküllerin fitoremediasyonu, Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg.(Derl), Cilt:5, Sayı:2, 27-28.
- Uğurağ, D., 2013, Ag (I) iyonu için özel belleğe sahip iyon seçici elektrot geliştirilmesi, Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 40-54.
- Uslu, O., 2018, Biyojenik aminlerin tayini için yeni yöntemler geliştirilmesi, Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 3-97.
- Uweaza, Y., Bühlmann P., Uweaza, K., Tohda, K., Amemiya, S., 2000, Potentiometric selectivity coefficient of ion-selective electrodes, Pure Appl. Chem., 72, 1851-1856.
- W.H.O., 2008, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
- Yazıcı M., Tiyek İ., Ersoy, M.S., Alma, H., Dönmez, U., vd., 2016, Modifiye hummers yöntemiyle grafen oksit (GO) sentezi ve karakterizasyonu, Gazi University Journal of Science part C, 42.
- Yazıcı, B., 2017, Klenbuterol tayini için altın nanopartikül katkılı potansiyometrik immunosensör geliştirilmesi, Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 19-41.
- Yeo, E.J., Wagner, C., 1994, Tissue distribution of glycine N-methyltransferase, amajor folate-binding protein of liver, Proc Natl Acad Sci USA 91, 210-214.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Yılmaz, N., Akgül, Y., İmmünglobulinler ve sepsisemi, 2014, Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med., 34.
- Yuan, W., Shi, G., 2013, Graphene based gas sensors, J. Mater. Chem. A 1, 10078-10091.
- Yüksel, C., 2016, Alloimmünizasyonla oluşan anti-HLA antikorlarının mikrolenfositotoksosite yöntemi ile belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 5-8.
- Zihnioğlu, F., 2018, <https://tr.scribd.com/doc/106446285/Biyokimya-3>, erişim tarihi: 29.12.2018.