

**KİMYASAL SAVAŞ AJANLARININ TESPİTİNE YÖNELİK PARAOKSON
TEMELLİ SENSÖRLER GELİŞTİRİLMESİ**

Doktora Tezi

Ozan YAĞMUROĞLU

Eskişehir, 2017

**KİMYASAL SAVAŞ AJANLARININ TESPİTİNE YÖNELİK PARAOKSON
TEMELLİ SENSÖRLER GELİŞTİRİLMESİ**

Ozan YAĞMUROĞLU

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Ocak, 2017**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ozan YAĞMUROĞLU'nun "Kimyasal Savaş Ajanlarının Tespitine Yönelik Paraokson Temelli Sensörler Geliştirilmesi" başlıklı tezi ../../2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Kimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ

Üye : Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN

Üye : Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

Üye : Prof. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK

Üye : Doç. Dr. Tufan GÜRAY

Enstitü Müdürü

ÖZET
KİMYASAL SAVAŞ AJANLARININ TESPİTİNE YÖNELİK PARAOKSON
TEMELLİ SENSÖRLER GELİŞTİRİLMESİ

Ozan YAĞMUROĞLU

Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ocak, 2017

Danışman: Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ

Bu çalışmada; kimyasal savaş ajanlarının tespitine yönelik dört farklı yöntem geliştirilmiştir. Çalışmada organofosforlu bileşik olarak paraokson kullanılmıştır. Paraokson molekülü asetilkolinesteraz enzimini geri dönüşsüz olarak inhibe etmektedir. Bu yönüyle sinir ajanlarına benzemesinden dolayı tercih edilmiştir. Paraokson tayini için ilk olarak Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM) temelli sensör geliştirilmiştir. QCM elektrot yüzeyi asetilkolinesteraz (AChE) enzimi immobilize edilmiş nanolif ile kaplanmıştır. Analit çözeltisinin elektroda temasıyla paraokson molekülleri elektrot yüzeyinde bulunan AChE enzimine bağlanmıştır. Bu etkileşim sonucunda kütlede meydana gelen değişimden yararlanılarak analiz yapılmıştır. İkinci yöntem olarak; rutenyum tabanlı aminoasit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama (ANADOLUCA) yöntemine göre sentezlenen nano enzim sistemi kullanılmıştır. Bu maksatla AChE enzimini içeren nano enzim yapısı ANADOLUCA metoduyla sentezlenerek elde edilmiştir. Sentezlenen nano enzim ile analit arasındaki etkileşim sonucunda değişen floresans özelliğinden yararlanılarak analiz yapılmıştır. Üçüncü yöntem olarak; paraokson molekülünü seçici olarak tanıyan ve bağlayan reflaktometrik interferans spektroskopisi (RIfS) temelli sensör geliştirilmiştir. Bu maksat ile karboksimetildekstran kaplı sensör sistemi aktive edilmiş ve AChE aktif yüzeye bağlanmıştır. Hazırlanan sensör sisteminin analit ile etkileşmesi sonucunda sensör yüzeyinden yansıyan ışın şiddetinde değişim meydana gelmiştir. Bu değişimden yararlanarak analiz yapılmıştır. Dördüncü yöntem olarak; potansiyometrik sensör geliştirilmiştir. Bu amaçla paraokson baskılı polimer hazırlanmıştır. Hazırlanan polimer sensör sisteminde tanıma tabakası olarak kullanılmıştır. Potansiyometrik sensörün analit ile etkileşmesi sonucunda ölçülen potansiyelde değişim meydana gelmiştir. Bu değişimden yararlanarak analiz yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Organofosfatlar, Kuvars kristal mikroterazi(QCM), Potansiyometri, Reflaktometrik interferans spektroskopisi(RIfS), Nanoenzim.

ABSTRACT
DEVELOPMENT OF PARAOXON BASED SENSORS FOR DETERMINATION
OF CHEMICAL WARFARE AGENTS

Ozan YAĞMUROĞLU

Chemistry Program

Anadolu University, Graduate School of Sciences, January, 2017

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sibel Emir DİLTEMİZ

In this study; Four different methods for detecting chemical warfare agents have been developed. Paraoxon molecule inhibits irreversibly the enzyme acetylcholinesterase. It is preferred on account of resembling nerve agents. As first method of study, quartz crystal microbalance (QCM) based sensor has been developed for determination the paraoxon molecule. QCM's electrode surface is coated with acetylcholinesterase(AChE) enzyme immobilized nanofibers. With the contact of analyte solution to electrode, paraoxon molecules are connected to the AChE enzyme which is on the surface of electrode. With the result of this interaction, the analysis is performed with utilizing the changes occurring in the mass. As second method of study, it is used the nano enzyme system which is synthesized according to method of photosensitive crosslinking with ruthenium based amino acid monomers (ANADOLUCA). With this purpose, AChE enzyme comprising nano enzyme structure was obtained by synthesizing with ANADOLUCA method. The analysis was performed utilizing fluorescence which is changed with the result of interaction between the analyte and synthesized nano enzyme. As third method of study, refractometric interference spectroscopy based sensor has been developed which recognise paraoxon molecule and bind it. With this purpose, carboxymethyldextran coated sensor system is activated and AChE enzyme is binded to this active surface. Changes has occurred in the intensity of reflected beam with the result of interaction between analyte and prepared sensor system. The analysis is performed by taking advantage of this change. As last method of study, potentiometric sensor has been developed. Paraoxon imprinted polymer was prepared with this purpose. The prepared polymer has been used as recognition layer in the sensor system. With the result of interaction between analyte and potentiometric sensor, changes has occurred in the measured potential. With this changes the analyse is performed.

Keywords: Organophosphates, Quartz Crystal Microbalance(QCM), Potentiometry, Refractometric Interference Spectroscopy(RIfS), Nanoenzyme.

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde, bilgi birikiminden ve tecrübesinden yararlandığım, her zaman büyük bir hoşgörü ile yaklaşan, desteğini heran hissettiğim Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ'e,

Deneysel çalışmalarım ve kendilerinden aldığım dersler boyunca ilgi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, yol göstericiliği ve değerli katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY, Prof. Dr. Arzu ERSÖZ, Prof. Dr. Deniz HÜR, Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ ve Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN'a,

Doktora eğitimime başvuru sürecimde ve eğitimim esnasında bana destek olan ve yol gösteren Hv.Svn.Alb. Haşim Ekiz, Hv.Svn.Yzb. Emre ÖZTAŞ ve Hv.Svn.Yzb. M.Can YÜCEL'e,

Doktora eğitimimi başarıyla tamamlamamda çok büyük etkisi olan analitik kimya bilgilerimin temelini atan Sayın Prof. Dr. Recai İNAM'a,

Tez çalışmam süresince destek ve yardımlarından dolayı, Yrd. Doç. Dr. Özlem BİÇEN ÜNLÜER, Arş. Gör. Dr. Sultan Funda EKTİ, Özlem KALABAK ve Kardelen ECEVİT'e

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, ilgi, sevgi ve güvenlerini her zaman hissettiğim Annem Şükran YAĞMUROĞLU, Babam Şahin YAĞMUROĞLU ve Kardeşim Ezgi YAĞMUROĞLU'na

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ozan YAĞMUROĞLU

Ocak-2017

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait özgün bir çalışma olduğunu, çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Ozan YAĞMUROĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABOLALAR DİZİNİ.....	xvii
GÖRSELLER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kimyasal Savaş Ajanları	1
1.1.1. Kimyasal savaş.....	3
1.1.1.1. Kimyasal ajanların vücuda giriş yolları ve çeşitleri	4
1.2. Pestisitler	5
1.2.1. Pestisitlerin sınıflandırılması	5
1.2.2. Organofosforlu bileşikler ve genel özellikleri	6
1.2.2.1. Organofosforlu bileşiklerin kimyasal yapısı.....	6
1.2.2.1.1. Paraokson.....	7
1.2.2.1.2. Paraoksonaz (PON) (EC 3.1.8.1)	7
1.3. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimi (EC 3.1.1.7).....	9
1.3.1. AChE enziminin organofosforlu birleşiklerle etkileşimi	11
1.4. Sensörler.....	12
1.4.1. Kimyasal sensörler	13
1.4.1.1. Potansiyometrik sensörler	16
1.4.1.1.1. Potansiyometrik tayin ilkesi	16
1.4.1.1.2. Referans elektrotlar	18
1.4.1.1.3. İyon-seçici elektrotlar	21
1.4.1.2. Kütle hassas sensörler	26
1.4.1.2.1. Piezoelektrik etki.....	27

1.4.1.2.2. Sauerbrey eşitliği.....	29
1.4.1.2.3. Kuvars kristal mikroterazi.....	31
1.5. Floresans Spektroskopisi.....	33
1.5.1. Floresansı etkileyen faktörler.....	35
1.5.2. Floresans spektrometre.....	37
1.6. Reflaktometrik İnterferans Spektroskopisi (RİfS).....	38
1.7. Moleküler Baskılanmış Polimerler.....	40
1.7.1. Moleküler baskılama tekniği.....	41
1.7.2. Moleküler baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcılar	46
1.7.3. Moleküler baskılamada kullanılan çözücüler.....	48
1.7.4. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulama alanları	49
1.8. Elektro-Çekme Yöntemi.....	49
1.8.1. Elektro-çekme sisteminin çalışma prensibi.....	50
1.8.2. Elektro-çekme işlemine etki eden değişkenler	53
1.8.2.1. Çözelti değişkenleri.....	53
1.8.2.2. Çalışma şartları	54
1.8.2.3. Çevresel koşullar	56
1.9. Nanoteknoloji.....	57
1.9.1. Nanopartiküller	58
1.9.1.1. Nanopartiküllerin üretim yöntemleri.....	59
1.9.1.1.1. Kimyasal buhar yoğunlaştırma yöntemi.....	61
1.9.1.1.2. Hidrojen redüksiyonu yöntemi	61
1.9.1.1.3. Asal gaz yoğunlaştırma yöntemi	61
1.9.1.1.4. Mikroheterojen sistemler yardımıyla nanopartikül eldesi.....	61
1.9.1.1.5. Alev sentezi ile nanopartikül eldesi	62
1.9.1.1.6. Mekanik aşındırma ile nanopartikül eldesi	62
1.9.1.1.7. Ultrasonik sprey piroliz ile nanopartikül eldesi	62
1.9.1.1.8. Rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama ve ANADOLUCA ...	62
2. MATERYAL VE METOT	64
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	64
2.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	64

2.3. QCM Sensörün Hazırlanışı.....	65
2.3.1. Poli(stiren-alt-maleik anhidrid) polimerinin sentezi.....	65
2.3.2. Elektro-çekme yöntemiyle nanolif elde etmek için PSMA çözeltilerinin hazırlanması.....	65
2.3.3. Elektro-çekme düzeneğinin kurulması.....	66
2.3.4. Elektro-çekme sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi.....	67
2.3.5. Elde edilen PSMA nanoliflerinin çapraz bağlanması	67
2.3.6. Çapraz bağlı PSMA nanoliflerine HRP(Horseradish Peroksidaz) enzim immobilizasyonu.....	68
2.3.7. Kuvars elektrot yüzeyinin fonksiyonelize edilmesi	68
2.3.8. QCM elektrot yüzeyinde tanıyıcı tabakanın oluşturulması	69
2.4. Nano AChE Enzimi.....	70
2.4.1. Nano AChE sentezi ve karakterizasyonu	70
2.4.2. Nano AChE enziminin paraokson ile etkileşiminin incelenmesi.....	70
2.4.3. Uygun çalışma pH'sının belirlenmesi	71
2.5. Refraktometrik İnterferans Spektroskopisi (RIFS)	71
2.5.1. CMD (Karboksimetildekstran) çip yüzey aktivasyonu.....	71
2.5.2. CMD çip yüzeyine AChE immobilizasyonu.....	72
2.5.3. Paraokson çözeltilerinin çip yüzeyine uygulanarak ölçümlerinin yapılması.....	73
2.6. Potansiyometrik Sensör	74
2.6.1. N-metakriloil-(L)-Serin (MA-Serin) monomerinin sentezi	74
2.6.2. Paraokson baskılı polimer hazırlanması.....	75
2.6.3. Paraokson seçici elektrotun hazırlanması.....	75
3. BULGULAR VE YORUM	78
3.1. QCM Sensör İle İlgili Elde Edilen Bulgular.....	78
3.1.1. Elektro-çekme sisteminin çalışma şartları	78
3.1.2. %30(wt/wt) PSMA/DMSO nanoliflerinin çapraz bağlanması	82
3.1.3. Çapraz bağlı nanoliflere HRP immobilizasyonu	82
3.1.4. Kuvars kristal yüzeylerinin asetilkolinesteraz immobilize nanolif ile kaplanması	83
3.1.5. Tanıyıcı tabaka ile kaplı kuvars kristal elektrotunun analit ile etkileşimi	83

3.2. Nano AChE Enzimi İle İlgili Elde Edilen Bulgular	86
3.2.1. Nano AChE enzimi ile numune analizinde çalışılacak dalga boyunun belirlenmesi	86
3.2.2. Nano AChE enzimi ile numune analizinde çalışılacak pH'nın belirlenmesi	89
3.2.3. Nano AChE enzimi ile artan derişimdeki paraokson arasındaki etkileşimin incelenmesi.....	89
3.2.4. Floresans ölçümleri sonucunda elde edilen paraoksona ait kalibrasyon grafiğı.....	94
3.3. Reflaktometrik İnterferans Spektroskopisi (RIfS) Temelli Sensör İle İlgili Elde Edilen Bulgular	95
3.3.1. AChE immobilize CMD çipin spektrumunun alınması.....	95
3.3.2. Farklı derişimlerdeki paraokson çözeltilerinin spektrumlarının alınması.....	95
3.3.3. RIfS ölçümleri sonucunda paraoksona ait kalibrasyon grafiğinin çizilmesi	99
3.4. Potansiyometrik Sensör İle İlgili Elde Edilen Bulgular	100
3.4.1. Potansiyometrik sensör için şartlandırma yapılması.....	101
3.4.2. Çalışma pH'sının belirlenmesi	102
3.4.3. Potansiyometrik ölçümler sonucunda paraoksona ait kalibrasyon grafiğinin çizilmesi.....	103
3.4.4. Potansiyometrik sensörün seçiciliğinin belirlenmesi.....	104
3.4.5. Girişim etkisinin incelenmesi.....	105
3.4.6 Paraokson baskılanmamış polimerle (NIP) ölçüm alınarak MIP ile kıyaslanması.....	106
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	108
KAYNAKÇA.....	114
ÖZGEÇMİŞ	123

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kimyasal ajanların sınıflandırılması	4
Şekil 1.2. Pestisitlerin sınıflandırılması.....	6
Şekil 1.3. Organofosforlu bileşiklerin genel kimyasal yapısı	7
Şekil 1.4. Paraoksonun (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat) kimyasal yapısı	7
Şekil 1.5. PON1 geninin 7. kromozom üzerindeki yeri	8
Şekil 1.6. PON1 enziminin üç boyutlu yapısı	9
Şekil 1.7. Paraoksonun PON1 enzimi tarafından hidrolizi	9
Şekil 1.8. AChE enziminin X-Ray görüntüsü	10
Şekil 1.9. Asetilkolinin hidroliz reaksiyonu.....	10
Şekil 1.10. OPB'ler ile AChE arasındaki reaksiyon	11
Şekil 1.11. Sinir hücrelerinde asetilkolin birikiminin şematik gösterimi.....	12
Şekil 1.12. Sensörlerin çalışma prensibi	13
Şekil 1.13. Optik sensörlerin çalışma prensibi.....	14
Şekil 1.14. Potansiyometrik sistem	16
Şekil 1.15. Standart hidrojen elektrot.....	19
Şekil 1.16. Kalomel referans elektrot.....	20
Şekil 1.17. Gümüş/gümüş klorür referans elektrot	21
Şekil 1.18. Camın membranda meydana iyon değişimi.....	22
Şekil 1.19. Katı-hal tipi iyon seçici elektrot.....	23
Şekil 1.20. Potansiyometrik enzim elektrot	24

Şekil 1.21. ISFET elektrodu.....	24
Şekil 1.22. Sıvı-membran iyon seçici elektrod	25
Şekil 1.23. Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi	27
Şekil 1.24. Kuvars Kristali üzerindeki piezoelektrik etki	28
Şekil 1.25. AT-kesim kuvars kristal düzlemi	29
Şekil 1.26. Kuvars kristal mikroterazinin basitleştirilmiş bir modeli	29
Şekil 1.27. Kuvars mikro terazinin çalışma prensibi	32
Şekil 1.28. Kuvars kristal elektrot.....	32
Şekil 1.29. Elektromanyetik spektrum bölgeleri	33
Şekil 1.30. Jablonski Diyagramı	34
Şekil 1.31. Singlet ve triplet hal	35
Şekil 1.32. Floresans spektrometresi çalışma prensibi.....	37
Şekil 1.33. CMD çip.....	38
Şekil 1.34. Cam biyoçipin kullanımı.....	39
Şekil 1.35. Cam biyoçipin analit ile etkileşimi ile kalınlığının artışı.....	39
Şekil 1.36. Refloktometrik interferans spektroskopisi ölçüm basamakları.....	40
Şekil 1.37. Moleküler baskılı polimer hazırlama aşamaları.....	42
Şekil 1.38. Kovalent baskılama yöntemi.....	42
Şekil 1.39. Kovalent olmayan baskılama yöntemi	43
Şekil 1.40. 2,2'-azobis(izobutironitril) (AIBN)'nin termal bozunma reaksiyonu	44
Şekil 1.41. Oksijen ile başlatıcı radikal arasındaki reaksiyon.....	44

Şekil 1.42. Elektro-çekme çalışma düzeneği	51
Şekil 1.43. Nanolif oluşumunun şematik gösterimi	52
Şekil 1.44. Elektro-çekme işlemine etki eden değişkenler	53
Şekil 1.45. Elektro-çekme işleminde kullanılan bazı toplayıcılar	56
Şekil 1.46. Boyut skalası	57
Şekil 1.47. Nanopartikül üretiminde kullanılan yöntemler	60
Şekil 1.48. Nanopartiküllerin başlangıç fazlarına göre üretim yöntemleri.....	60
Şekil 2.1. PSMA'nın sentez tepkimesi	65
Şekil 2.2. Elektro-çekme deney düzeneğinin şematik gösterimi.....	66
Şekil 2.3. Laboratuvarı kurulan elektro-çekme düzeneği	66
Şekil 2.4. PSMA'nın çapraz bağlanması tepkimesi	67
Şekil 2.5. QCM elektrotun 4-aminotiyofenol ile fonksiyonilize edilişi	68
Şekil 2.6. QCM elektrot yüzeyinde tanıyıcı tabakanın oluşturulma şeması.....	69
Şekil 2.7. Nano AChE yapısı.....	70
Şekil 2.8. NHS/EDC çözeltisinin çip yüzeyine verilmesi	72
Şekil 2.9. CMD çipin yüzey aktivasyonunun şematik gösterimi	72
Şekil 2.10. CMD çip yüzeyine AChE immobilizasyonu.....	73
Şekil 2.11. Hazırlanan paraokson çözeltileri	73
Şekil 2.12. MA-Serinin sentez reaksiyonu.	74
Şekil 2.13. Elektrotun molekül baskılanmış polimerle doldurulması	76
Şekil 2.14. Kuruması için oda sıcaklığında bekletilen elektrot	76

Şekil 3.1. Ön çalışma yapılan şartlar	78
Şekil 3.2. %30(wt/wt) PSMA/DMSO çözeltisinden boncuklu yapıda elde edilen nanolifler	79
Şekil 3.3. %30(wt/wt) PSMA/DMSO çözeltisinden boncuksuz yapıda elde edilen nanolif	79
Şekil 3.4. %30(wt/wt) PSMA/DMF çözeltisinden boncuklu yapıda elde edilen nanolifler	80
Şekil 3.5. %30(wt/wt) PSMA/DMF çözeltisinden boncuksuz yapıda elde edilen nanolif	80
Şekil 3.6. %15(wt/wt) PSMA/%2,5(wt/wt) PVA/DMSO çözeltisinden boncuklu yapıda elde edilen nanolifler	81
Şekil 3.7. %15(wt/wt) PSMA/%2,5(wt/wt) çözeltisinden boncuksuz yapıda elde edilen nanolif	81
Şekil 3.8. %30(wt/wt) PSMA/DMSO çözeltisinden elde edilen nanolifler	82
Şekil 3.9. Enzim immobilize edilmiş nanolifin substrat ile etkileşimi	83
Şekil 3.10. Nanolif ile kaplı kuvars kristal yüzey	83
Şekil 3.11. Kuvars kristal elektrotun paraokson ile etkileşimi sonucundaki frekans değişimi	84
Şekil 3.12. QCM biyosensörde farklı derişimlerdeki paraokson numunelerine ait kalibrasyon grafiğı	84
Şekil 3.13. Elektrot yüzeyindeki kütle değişimine karşı analit derişimindeki değişim grafiğı	85
Şekil 3.14. Elektrot yüzeyindeki kütle değişimine karşı analit derişimindeki değişim grafiğı	86
Şekil 3.15. 150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu	87
Şekil 3.16. 150 ppm paraokson içeren numunenin 310 nm dalga boyundaki floresans spektrumu	87
Şekil 3.17. 150 ppm paraokson içeren numunenin 350 nm dalga boyundaki floresans spektrumu	88
Şekil 3.18. 150 ppm paraokson içeren numunenin 625 nm dalga boyundaki floresans spektrumu	88

Şekil 3.19. 0,01 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu	90
Şekil 3.20. 0, 1 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu	90
Şekil 3.21. 1 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu	91
Şekil 3.22. 10 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu	91
Şekil 3.23. 50 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu.....	92
Şekil 3.24. 100 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu	92
Şekil 3.25. 150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu	93
Şekil 3.26. 200 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu	93
Şekil 3.27. Farklı derişimlerdeki paraokson numunelerine ait kalibrasyon grafiğı....	94
Şekil 3.28. AChE enzim immobilizasyonu sonucu elde edilen spektrum.....	95
Şekil 3.29. 0,01 ppm paraokson çözeltisi spektrumu	96
Şekil 3.30. 0,1 ppm paraokson çözeltisi spektrumu	97
Şekil 3.31. 1 ppm paraokson çözeltisi spektrumu	97
Şekil 3.32. 10 ppm paraokson çözeltisi spektrumu	98
Şekil 3.33. 50 ppm paraokson çözeltisi spektrumu	98
Şekil 3.34. 100 ppm paraokson çözeltisi spektrumu	99
Şekil 3.35. 150 ppm paraokson çözeltisi spektrumu	99
Şekil 3.36. Reflaktometrik İnterferans Spektroskopisinde farklı derişimlerdeki paraokson numunelerine ait kalibrasyon grafiğı.....	100
Şekil 3.37. Hazırlanan elektrotun potansiyel (mV)-pH grafiğı (10 ppm paraokson içeren fosfat tamponu çözeltileri)	102

Şekil 3.38. Potansiyometrik sensörde farklı derişimlerdeki paraokson numunelerine ait kalibrasyon grafiğı	104
Şekil 3.39. Paraokson ve Parathion moleküllerinin potansiyel (mV) -log C (M) grafiğı.....	105

TABOLALAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Kimyasal silahlarda kullanılan kimyasallar	2
Tablo 1.2. Bazı kimyasal savaş ajanlarının fiziksel özellikleri	3
Tablo 1.3. Sıcaklık değişimiyle kuvars kristaliteli frekans kayması	31
Tablo 1.5. Molekül baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	47
Tablo 1.4. Moleküler baskılı polimer sentezinde kullanılan bazı monomerler.....	45
Tablo 3.1. Farklı pH değerlerinde elde edilen floresans şiddetleri	89
Tablo 3.2. Hazırlanan paraokson çözeltileri	96
Tablo 3.3. Paraokson çözeltileri için elde edilen ölçüm sonuçları.....	100
Tablo 3.4. 0,1 ppm Paraokson çözeltisi için şartlandırma verileri.....	101
Tablo 3.5. 0,1M KOH Paraokson çözeltisi için şartlandırma verileri.....	101
Tablo 3.6. 0,1M KCl çözeltisi için şartlandırma verileri	102
Tablo 3.7. Farklı derişimlerde paraokson içeren numunelerin potansiyel ölçümleri	103
Tablo 3.8. Farklı derişimlerde parathion içeren numunelerin potansiyel ölçümleri	105
Tablo 3.9. Girişim etkisini incelemek için hazırlanan çözeltiler	106
Tablo 3.10. NIP ile hazırlanan tanıma tabakasıyla alınan ölçümler	106
Tablo 4.1. Geliştirilen sensörlerin LOD(Gözlenebilme Sınırı), LOQ(Tayin Sınırı) değerlerinin karşılaştırılması.....	112
Tablo 4.2. Geliştirilen sensörler ile farklı sensörlerin karşılaştırılması	113

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 1.1. Kuvars kristal elektrot	32
Görsel 1.2. CMD çip	38
Görsel 2.1. Laboratuvarda kurulan elektro-çekme düzeneği	66
Görsel 2.2. NHS/EDC çözeltisinin çip yüzeyine verilmesi	72
Görsel 2.3. CMD çip yüzeyine AChE immobilizasyonu (a) enzim çözeltisi (b) sistem parametreleri	73
Görsel 2.4. Elektrotun molekül baskılanmış polimer içeren bulamaç ile doldurulması.....	76
Görsel 2.5. Kuruması için oda sıcaklığında bekletilen elektrot	76
Görsel 3.1. Enzim immobilize edilmiş nanolifin substrat ile etkileşimi. (a) substrat ile etkileşmemiş nanolif (b) substrat ile etkileşen nanolif.....	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
AIBN	: 2,2'-azobisisobütironitril
APS	: Amonyum persülfat
CMD	: Karboksimetildekstran
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMF	: Dimetilformamid
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDC	: (3-Dimetillaminopropil)-N'-etilkarbodiimid
EDMA	: Etilenglikoldimetakrilat
EMK	: Elektrostatik motor kuvveti
HRP	: Horseardish (Bayır turbu) peroksidaz
ISA	: Instrument Society of America
ISE	: İyon-seçici elektrotlar
ISFET	: İyon-seçici alan etki transistörleri
MA-Bt	: Metakriloil benzotriazol
MA-Serin	: N-metakriloil-(L)-Serin
MIP :	: Molekül baskılanmış polimerler
NHS	: N-hidroksisüksinimid
OPB	: Organofosforlu bileşikler
PSMA	: Poli(stiren-alt-maleik anhidrid)
RIfS	: Reflaktometrik İnterferans Spektroskopisi
TMB	: Tetrametil benzidin

1. GİRİŞ

Kimyasal silahların keşfiyle birlikte insanoğlu büyük bir tehdit ile karşı karşıya kalmıştır. Bu silahların kitlesel insan ölümlerine sebebiyet vermesi ve nispeten geliştirilmesinin kolay olması ülkeleri bu konuda önlem almak zorunda bırakmıştır. I. Dünya Savaşı esnasında kimyasal silahlar nedeniyle 2 milyona yakın insan hayatını kaybetmiştir. II. Dünya Savaşı başlamadan ise sinir ajanları kimyasal silah yapımında kullanılmaya başlanmıştır. Böylece kimyasal silahların insanlık üzerindeki tehdidi çok daha kritik bir noktaya ulaşmıştır. Özellikle II. Dünya Savaşı ve soğuk savaş döneminde kimyasal silah geliştirilmesi ve sinir ajanı üretimi hiç olmadığı kadar artmıştır.

Ülkeler tarafından geliştirilen kimyasal silahlar ilerleyen zamanlarda terörist grupların eline geçmeye başlamıştır. 1994 yılında Japonya'nın Matsumoto şehrindeki meydana gelen terör saldırısında sarin gazı kullanılmıştır. Yaşanan bu olay sarin gazının kullanıldığı ilk terör saldırısı olarak tarihe geçmiştir.

Uluslararası yapılan antlaşmalar ve düzenleyici kurallarla bilimsel çalışmalarda sinir ajanlarının kullanımı yasaklanmıştır. Bu düzenlemeler sonucunda sinir ajanlarının elde edilmesi zorlaşmıştır. Sinir ajanlarının elde edilememesinden oluşan boşluk organofosforlu bileşiklerin kullanılmasıyla kapatılmıştır. Organofosforlu bileşikler toksik etkileri bakımından sinir ajanlarına benzemektedirler. Bu bileşikler tarım alanında dünyada yaygın olarak kullanılmakta ve kolayca bulunabilmektedirler. Bu durum organofosforlu bileşikler üzerine çalışma yapılmasının önemini ortaya koymaktadır. Dünyada oluşan ortam göstermektedir ki; kimyasal silah üretiminde, ulaşılması çok kolay olan organofosforlu bileşiklerin kullanımı gitgide artacaktır.

Bu tez çalışmasında, kimyasal savaş ajanlarının tespitine yönelik paraokson temelli sensörler geliştirilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Kimyasal Savaş Ajanları

Toksik etkileri sonucunda canlıları; öldürme, yaralama veya temel yaşam fonksiyonlarını bozarak etkisiz hale getirme gibi özelliklere sahip kimyasal maddelere genel olarak kimyasal savaş ajanı denilmektedir. 1993 yılında imzalanan kimyasal silahlar konvansiyonu ise; kimyasal silah olarak tipleri ve miktarları uygun olan ve bunları elde etmek için kullanılan kimyasal savaş ajanları, bu kimyasalları kullanmak için gerekli cihaz ve mühimmatlar ve bunların kullanımına yönelik özel olarak tasarlanmış her türlü teçhizatı kimyasal silah olarak tanımlamıştır. Bu silahlar; insanları öldürmenin yanında, bitkisel ve hayvansal besin stoklarını bulaş ile kullanılamaz hale

getirme, ekonomik değeri yüksek hedefleri işlemez hale getirme, asker ve sivil personeli koruyucu giysi ve araç kullanmak zorunda bırakarak hareket kabiliyetlerini azaltma ve askeri birlikleri istenilmeyen yönlerle sevk etme gibi amaçlarla kullanılır [1].

Kimyasal maddeler doğada katı, sıvı ve gaz halindedir. Uçucu olmaları ve daha geniş alanlara daha kısa sürede yayılabilme özelliklerinden dolayı kimyasal silah yapımında kullanılan kimyasal ajanların gaz formu tercih edilir. Suda ve organik çözücülerde az veya çok çözünme özelliğine sahiptirler. Kimyasal silaha maruz kalan canlıların verdiği tepkiler aynı ölçüde olmamaktadır. Vücuda giren kimyasal ajanları deaktive ederek etkilerini minimize eden paraoksonaz gibi enzimler her insanda aynı miktarda bulunmamaktadır. Dolayısıyla insanlar ırk, cinsiyet ve yaşanan coğrafi bölgenin özellikleri gibi faktörlere bağlı olarak kimyasal ajanlara karşı farklı duyarlılık gösterirler [2].

Kimyasal ajanlar vücuda deri, solunum ve gözler yoluyla girmektedir. Kimyasal ajanlar gaz, buhar veya aerosol halinde solunduğunda burun ve ağız yoluyla vücuda girmektedir. Gözler kimyasal ajanları doğrudan emerek kan dolaşımına dahil edebilir. Sıvı veya katı haldeki kimyasal ajanlar ise deriyle temas ettiğinde etkilerini gösterirler. Kimyasal silahlar; fiziksel ve kimyasal özelliklerine, askeri kullanım amacına veya toksik özelliklerine ve etkilerine göre farklı sınıflara ayrılabilir. Kimyasal silahlarda kullanılan kimyasallar Tablo 1.1.'de verilmiştir [3].

Tablo 1.1. *Kimyasal silahlarda kullanılan kimyasallar*

Kimyasal Savaş Ajanı	Kullanılan Kimyasal
Sinir Ajanları	Tabun, Sarin, Soman
Yakıcı Ajanlar	Mustard, Azotlu mustard, Levisit
Akciğer Zedeleyiciler	Fosgen, Difosgen, Klor, Klorpikrin
Sistemik Zehirler	Hidrojen siyanür, hidrojen klorür, hidrojen sülfür
Kapasite Bozucular	BZ (3-kuinuklidinil benzilat), LSD(Liserjik asit dimetilamid)
Kargaşa Kontrol Ajanları	CN(Kloroasetofenon), CS(o-klorobenzalmalononitril), CR(dibenzazepin),

Sınıflandırılması yapılan kimyasal savaş ajanlarının bazılarının fiziksel özellikleri Tablo 1.2.'de verilmiştir. Tablo incelendiğinde uçuculuk özelliği en fazla olanın sarin, öldürücülük açısından en tehlikeli olanın soman olduğu görülmüştür.

Tablo 1.2. Bazı kimyasal savaş ajanlarının fiziksel özellikleri

	TABUN	SARİN	SOMAN
Buhar Basıncı (mmHg,20 °C)	0,037	2,9	0,4
Yoğunluk (g/mL, 25°C)	1,08	1,10	1,02
Donma Noktası (°C)	-5	-56	-42
Kaynama Noktası (°C)	230	158	198
Uçuculuk Özelliği (mg/m ³ , 25°C)	610	22000	3900
%50 Öldürücü konsantrasyon (mg.dak/m ³)	15000	10000	2500
%50 Öldürücü doz (mg/kg)	1500	1700	350
Kokusu	Meyve Kokusu	Kokusuz	Meyve Kokusu

1.1.1. Kimyasal savaş

Kimyasal silahların savaş alanında düşman ülkelere karşı kullanılmasıyla ortaya çıkan duruma ise kimyasal savaş denilmektedir.

Kimyasal silahların üretimi ve kullanımı I'inci Dünya Savaşı ile başlamıştır. Savaş alanında kullanılan ilk kimyasal silah 1915 yılında Almanya tarafından Belçika'ya atılan klor gazıdır. Bu saldırı sonucunda yaklaşık 5000 kişi hayatını kaybetmiştir. 1914-1918 yılları arasında gerçekleşen I.Dunya Savaşı sırasında 113,500 ton toksik kimyasal madde kullanılmıştır. Avrupada yaklaşık 1,5 milyon kişi bu kimyasal maddelere maruz kalmıştır. Yaklaşık 1,5 milyon vakanın 90.000'i ölümle sonuçlanmıştır.

I'inci Dünya Savaşından sonra kimyasal silahlara karşı savunma yöntemleri geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızlanmıştır. Kimyasal silahlara karşı geliştirilen yöntemler ise zaman içerisinde kimyasal savunma olarak tanımlanmaya başlanmıştır [4].

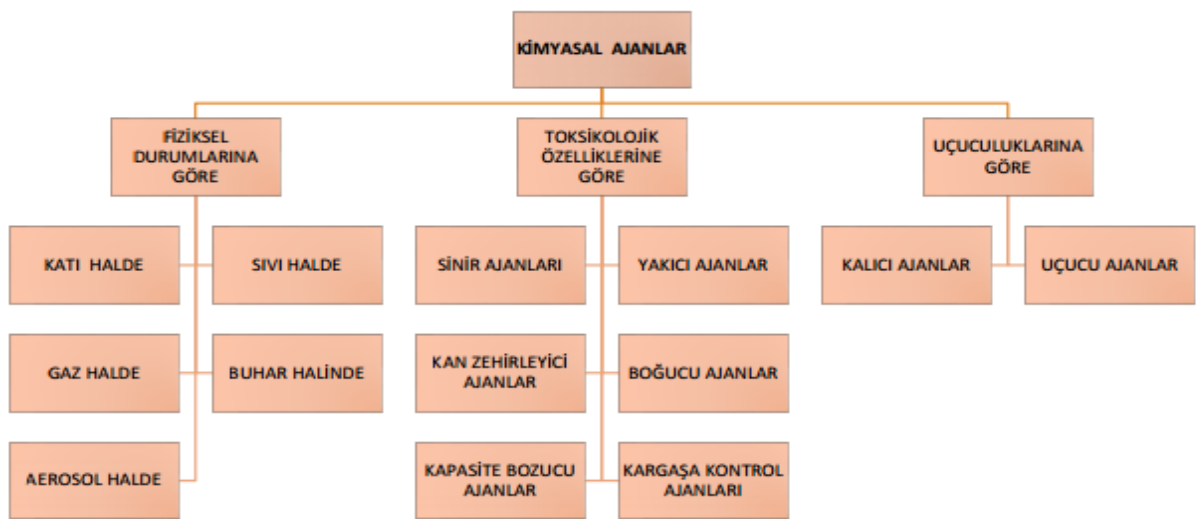
1.1.1.1. Kimyasal ajanların vücuda giriş yolları ve çeşitleri

Kimyasal maddeler katı, sıvı ve gaz halinde bulunmaktadır. Kimyasal savaş ajanları uçuculuk özelliğinden dolayı çoğu zaman gaz halinde bulunurlar. Kokuları karakteristik olabileceği gibi kokusuz olarakta bulunabilirler. Suda veya diğer çözücülerde farklı çözünme özelliği gösterebilirler [1, 2].

Kimyasal silahlara karşı canlıların hepsi aynı oranda ve şekilde tepki vermezler. Tepkinin şeklini ve seviyesini belirleyen canlının ırk, cinsiyet ve yaş gibi özellikleridir [3].

Kimyasal savaş ajanları insan vücuduna farklı yollarla girebilir. Buhar, gaz ve aerosoller halinde bulunduğu burun ve ağız mukozasından akciğer alveollerine kadar herhangi bir yerden emilebilirler. Gözle temas edildiğinde dahi kimyasal ajanlar vücuda giriş yapabilirler. Sıvı ve katı parçacıklar ise genellikle deri ve müköz membranlarının yüzeyinden emilebilirler. İçme suyu veya besinlere bulaşmaları halinde ise sindirim sistemi kanalıyla vücut dolaşımına katılabilirler [5, 6].

Kimyasal ajanların fiziksel durumları, toksikolojik özellikleri ve uçuculuklarına göre sınıflandırılması Şekil 1.1'de verildiği gibidir.



Şekil 1.1. Kimyasal ajanların sınıflandırılması

1.2. Pestisitler

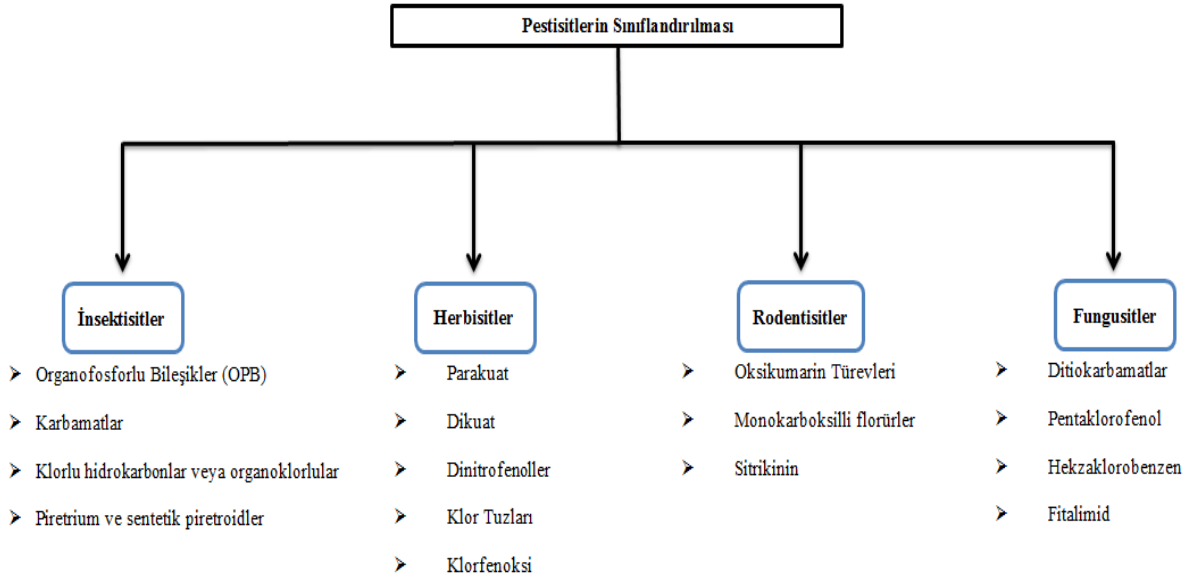
Pestisitler, tarım ürünlerinin yetiştirilmesi, depolanması ve tüketilmesi sırasında bitkiye ve bitkiyi tüketen canlıya zarar veren haşere ve mikroorganizmaları yok etmek amacıyla kullanılan kimyasallardır [7-8].

Tarımsal alanda haşere ile mücadelede en yoğun kullanılan yöntem pestisit kullanımıdır. Bunun nedeni; pestisit kullanımının uygun şekilde yapıldığında daha etkili ve hızlı sonuçlar vermesidir. Bu şekilde tarlada yetiştirilen ürününün gelişiminin istenilen şekilde olması sağlanmaktadır [9]. Pestisitler kullanılırken sadece hedef seçilen zararlılara etkili olması istenmektedir. Ancak kullanımları esnasında hava, su ve toprağa karışarak hedefin dışındaki canlılara da zarar verebilmektedirler. Bunun yanı sıra bilinçsiz kullanımdan dolayı da suda, toprakta, bitkisel ve hayvansal besinlerde yüksek oranlarda birikirler [10]. Pestisitler nerdeyse her türlü ortamda bulunabilmektedirler. Yeryüzünde bulunan bütün canlılar pestisitlerden etkilenirler. Ancak pestisitlerden en çok etkilenen besin gruplarının başında meyveler gelmektedir [11].

Pestisitlerin yoğun kullanılmasından en fazla etkilenen kişiler tarım alanında çalışanlardır. Tarım alanında çalışan kişilerin kanlarında yapılan analizlerde pestisit kalıntılarına rastlanmaktadır. Bu durum pestisite maruz kalanların organlarında ve enzim sistemlerinde olumsuz sonuçlara yol açmaktadır. Özellikle paraoksonaz (PON) enzimi insektisit ve sinir gazı yapımında yaygın kullanıma sahip organofosfat bileşiklerinin hidrolizini katalizlemekte kullanılan önemli bir enzimdir. Bu enzimde meydana gelen değişikliklerden yararlanılarak pestisitlerden ne kadar etkilendiği bulunmaktadır [12].

1.2.1. Pestisitlerin sınıflandırılması

Pestisitleri, yok etmek için kullanıldıkları parazit çeşitlerine göre ve yapılarındaki kimyasal bileşenlere göre gruplandırmak mümkündür. Bu kapsamda pestisitlerin sınıflandırılması Şekil 1.2’de gösterildiği gibidir.



Şekil 1.2. *Pestisitlerin sınıflandırılması*

İnsektisitler, bitki, toprak ve hayvanlarda yaşayan böcekleri yok etme amacıyla kullanılan pestisitlerdir. Akarsitler, örümcek, bit ve kenelere karşı kullanılırken, afisitler ise yaprak bitlerine karşı kullanılır. Rodentisitler; tarımda fare, sıçan ve diğer kemiriciler gibi zararlı hayvanlara karşı kullanılan pestisitlerdir. Fungusitler, mantar ve mantar sporlarının öldürülmesi veya kontrol altına alınması maksadıyla kullanılan pestisitlerdir. Türkiye’de yoğun olarak kullanılmaktadırlar. Herbisitler, tarım alanında yabancı otlarla mücadele etmek amacıyla kullanılan bir pestisittir [12, 13, 14].

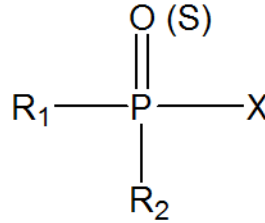
1.2.2. Organofosforlu bileşikler ve genel özellikleri

Organofosforlu bileşikler etkilerini sinir iletimini engelleyerek gösterirler. Bu bileşikler yapıları bakımından genel olarak esterler, amidler ve fosforik asidin tüol türevleridir. Organofosfatlar lipid çözünürlüğe sahiptirler. Bundan dolayı deri, mukoza, konjoktiv ve solunum yolları tarafından vücuda alınırlar. Ayrıca hayvan ve insan tıbbında kimyasal ajan veya ilaç olarak sinir sistemi çalışmalarında ve askeri amaçlarla kimyasal savaş ajanı olarak da kullanılmaktadırlar. Bu grup kimyasallar en yaygın şekilde pestisit, insektisit, akarisit vb. olarak kullanılırlar ve ticari olarak kolayca elde edilebilirler [15, 16].

1.2.2.1. Organofosforlu bileşiklerin kimyasal yapısı

Genel kimyasal yapıları şu şekildedir; molekülün merkezinde fosfat atomu bulunmakta ve fosfat atomu oksijen veya sülfür ile çift bağ yapabilmektedir. Genel kimyasal yapıda bulunan R₁-R₂ hidrojen, alkil (siklik yapı dahil), aril, alkoksi, alkiltiyol

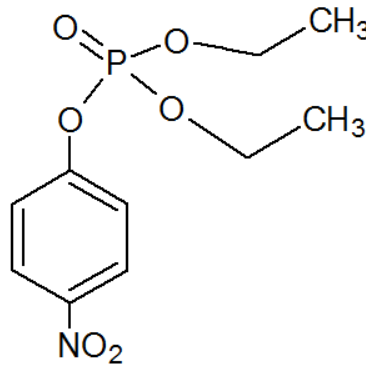
ve amino gruplarını temsil eder. X ise halojenleri, siyano ve tiyol gruplarını ve inorganik-organik asitleri temsil eder. Organofosforlu bileşiklerin genel kimyasal yapısı Şekil 1.3’de gösterildiği gibidir [17, 18].



Şekil 1.3. Organofosforlu bileşiklerin genel kimyasal yapısı

1.2.2.1.1. Paraokson

Paraokson, molekül ağırlığı 275,2 g/mol ve kapalı formülü C₁₀H₁₄NO₆P olan bir insektisittir. Kimyasal adı o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfattır. Paraokson molekülü insan vücudunda asetilkolinesteraz (AChE) enzimi inhibitörü olarak davranır. Paration molekülünün aktif metabolitidir. AChE enzimini inhibe etme yeteneği çok güçlüdür. İnsektisitler arasında inhibisyon açısından en kuvvetli organofosforlu birleşiklerden birisidir. Sinir ajanı sarinin %70 kuvvetindedir ve canlılarda toksik etkilere yol açacağından dolayı kullanımı kısıtlıdır. Deri tarafından emilimi oldukça kolaydır [19]. Paraokson molekülünün molekül yapısı Şekil 1.4’de verilmiştir.



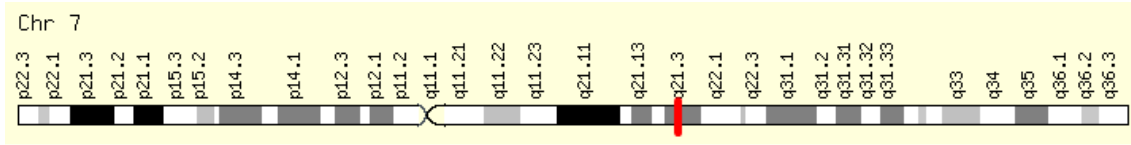
Şekil 1.4. Paraoksonun (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat) kimyasal yapısı

1.2.2.1.2. Paraoksonaz (PON) (EC 3.1.8.1)

Paraoksonaz enzimi hem insan hem de hayvan serumunda bulunan bir enzimdir. Metabolizmadaki görevi organofosfat moleküllerinin hidrolizini katalizlemektir. İnsan

kan serumunda ilk olarak 1953 yılında keşfedilen bir enzimdir. Paraokson ve parationa karşı spesifikliğı keşfedildikten sonra paraoksonaz olarak isimlendirilmiştir [20].

Paraoksonaz enziminin ilgili insan geni HUMPONA'dır. Bu gen 7q21.3 üstünde bulunmaktadır ve PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç üyeye sahiptir. Bu genler birbirlerine benzerlik göstermektedirler. PON1, PON2 ve PON3 genleri memeliler arasında; nükleotid seviyesinde %81-90, aminoasit seviyesinde %79-90 benzerlik gösterir [8]. PON1 geninin bulunduğu kromozom üzerindeki yeri Şekil 1.5.'de gösterilmiştir.

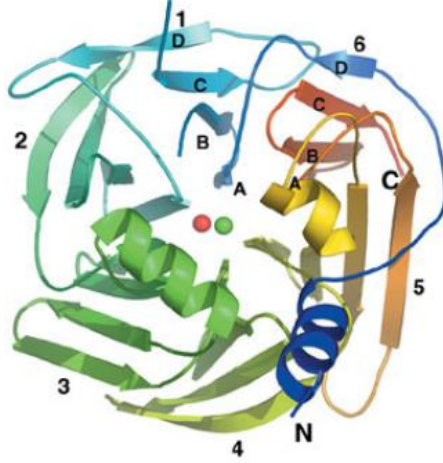


Şekil 1.5. *PON1 geninin 7. kromozom üzerindeki yeri*

PON1 ve PON3 karaciğerde bulunurken, PON2'nin karaciğerin yanı sıra kalp, beyin dokularında ve düz kas hücrelerinde de yer aldığı bilinmektedir. İnsan kan serumunda baskın olan PON1 enzimidir. PON1 enzimi 45 kDa ağırlığında ve 354 aminoasitten oluşan bir proteindir [8, 21].

PON1 enzimi kanda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır. Üstünde N-terminal bölgesi bulunmakta ve bu sayede lipitlere kolay bağlanabilmektedir. PON1 enzimi 45 kDa ağırlığında ve 354 aminoasiten oluşmaktadır [8, 22].

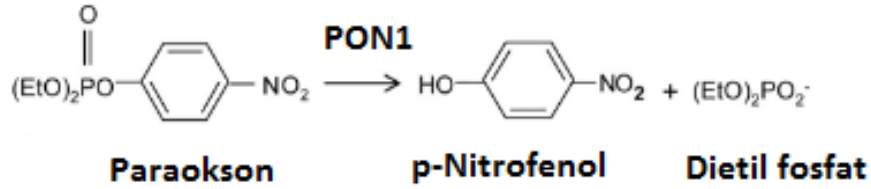
PON1 enziminin insan metabolizmasında aktivite gösterebilmesi için yapısında kalsiyum bulundurması gerekmektedir. Diğer esterazlar yapılarında kobalt, mangan ve magnezyum bulundurmaktadırlar. Bu özelliğı sebebiyle PON1 diğer esterazlardan ayrılmaktadır. PON1 enzimi yapısında iki tane Ca^{+2} ihtiva etmektedir. Bunlardan bir tanesi enzimin molekül yapısının en üstünde, diğeri ise merkez kısmında bulunmaktadır. Merkezdeki kalsiyum iyonu yapıdan uzaklaştırılırsa enzim denatüre olur ve bu olay geri dönüşümsüz olarak gerçekleşir. Yapının en üstünde bulunan kalsiyum iyonu ise katalitik etkinlik göstermektedir [8, 23]. PON1 enziminin yapısı Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1.6. *PON1* proteininin üç boyutlu yapısı. (Yapının ortasında görülen kırmızı ve yeşil daireler Kalsiyum iyonlarını temsil etmektedir.)

Kaynak: Josse,2002, s.87

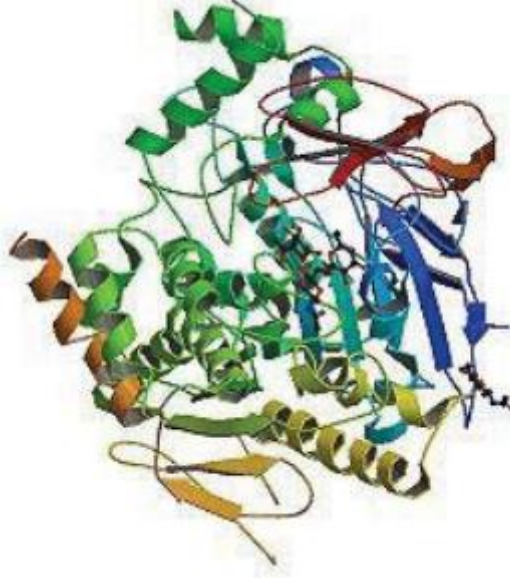
PON1 enzimi vücutta belli başlı üç aktiviteye sahiptir. Bunlar; hidrolaz aktivitesi, arilesteraz aktivitesi, arildialkil fosfataz aktivitesidir. Paraokson molekülünün PON1 enzimi tarafından hidrolizi Şekil 1.7’de verilmiştir.



Şekil 1.7. *Paraoksonun PON1 enzimi tarafından hidroliz*

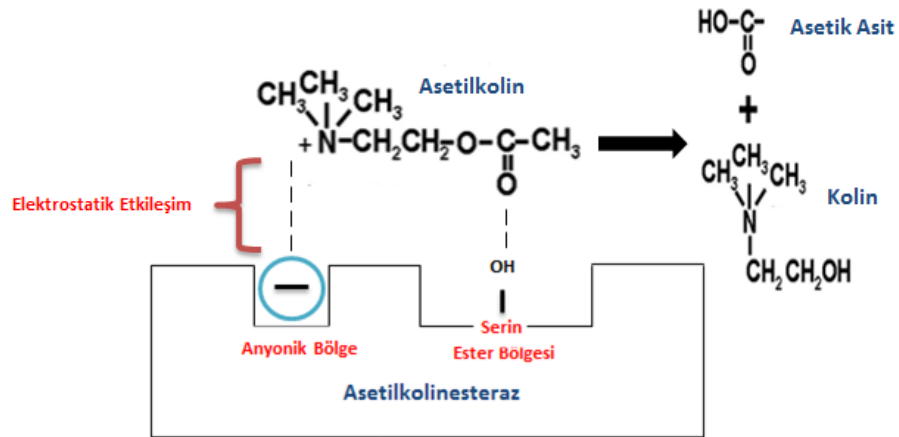
1.3. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimi (EC 3.1.1.7)

AChE enzimi esteraz ailesine üye bir serin hidrolazıdır. Asetilkolinesteraz enziminin vücuttaki rolü post-sinaptik membran üzerinde bulunan asetilkolini hidrolizleyerek sinyal iletimini sonlandırmaktır. Bu şekilde otonom sinir sisteminin düzgün çalışmasını sağlar. Asetilkolin molekülü ilk tanımlanan sinirsel uyarı iletici moleküldür. Asetik asit ile kolinin esteridir. Asetilkolin molekülü AChE tarafından hidrolize edilerek kolin ve asetik asite parçalanır [25]. AChE enzimine ait X-Ray görüntüsü Şekil 1.8’de verilmiştir.



Şekil 1.8. AChE enziminin X-Ray görüntüsü

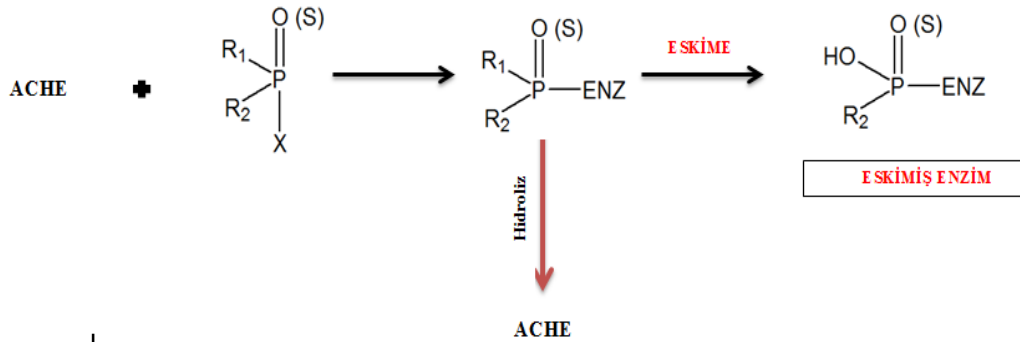
Asetilkolinesteraz enzimini kodlayan gen, insan gen yapısı içinde 7. kromozomun q22 bölgesinde bulunmaktadır. 60.000 dalton ağırlığında bir monomerdir. 45x60x65 Å'lık 14 alfa sarmalı tarafından çevrili, elipse benzer şekilde, 12 eğrilmiş, merkezde miks olmuş beta levhasından oluşan dimer veya tetramer halinde bulunan bir moleküldür. Yapısında 537 amino asit içeriğine sahip alfa/beta protein bulunmaktadır. Dizinin N terminalinde aspartik asit (Asp)1, C terminalinde ise Sistein (Cys)537 yer alır [25, 26]. Asetilkolinesteraz enziminin asetilkolin molekülünü hidroliz reaksiyonu Şekil 1.9'da verilmiştir.



Şekil 1.9. Asetilkolinin hidroliz reaksiyonu

1.3.1. AChE enziminin organofosforlu birleşiklerle etkileşimi

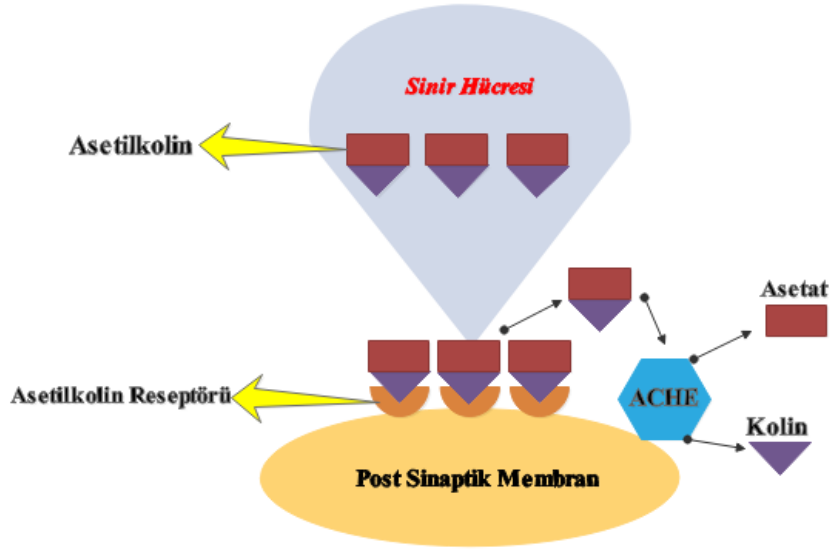
Organofosforlu bileşikler vücuttaki etkilerini asetilkolin estera z enziminin inhibisyonu üzerinden göstermektedir. OPB'ler AChE enziminin aktif bölgesinde bulunan serin amino asidine bağlanarak enzim tarafından hidrolize edilirler. Böylece enzimin aktif bölgesi fosforillenmiş olur. AChE enzimi ile OPB'ler arasındaki reaksiyon iki basamakta gerçekleşir. Öncelikle geri dönüşümlü enzim-inhibitör kompleksi oluşur. Bu kompleksin oluşum hızı organofosforlu bileşiğin yapısına, molekül büyüklüğüne ve alkil gruplarına bağlıdır. Geri dönüşümlü kompleks oluşumundan sonra yapıdaki alkil grubunun –OH ile yer değiştirmesi sonucu geri dönüşümsüz kompleks meydana gelir. Bu olay eskime olarak adlandırılır. Eskime olayının gerçekleşme zamanı maruz kalınan molekülün yapısına göre değişmektedir. Soman molekülüne maruz kalındıktan dakikalar sonra eskime olayı gerçekleşmesine rağmen, sarin ile bu süre 6 saat, tabun ve Vx ajanlarında ise bu süre yaklaşık olarak 50 saat civarında gerçekleşmektedir [6, 18]. OPB'ler ile AChE arasındaki reaksiyon Şekil 1.10'da verilmiştir.



Şekil 1.10 OPB'ler ile AChE arasındaki reaksiyon

AChE enziminin OPB'ler ile etkileşim inhibe olmasından dolayı sinaptik aralıkta bulunan asetilkolin molekülü parçalanamaz. Beyin tarafından gönderilen sinyaller sinir hücreleri tarafından aktarılırlar. Yollanan sinyaller sinaps boşluklarına gelene kadar yoluna devam eder sonrasında ise durur. Sinyalin gideceği noktaya ulaşabilmesi için sinaps boşluğunun dolması gerekmektedir. Sinaps boşluğunun dolmasını sağlayan kimyasal ise asetilkolin molekülüdür. Sinyal sinapse geldiğinde asetilkolin molekülleri sinaps boşluğunu doldurmaya başlarlar. Bunun sonucu olarak beyin tarafından gönderilen sinyaller iletileceği noktaya ulaşmış olurlar. İletim tamamlandıktan sonra asetilkolin tarafından doldurulan sinaps boşluğunun tekrar boşaltılması gerekmektedir.

Şayet bu gerçekleşmezse beyin tarafından gönderilen sinyaller karışacaktır. Asetilkolin molekülünün dolduğu sinaps boşluğundan temizlenmesini sağlayan ise asetilkolin esteraz enzimidir. Eğer bu enzim inhibe olursa asetilkolin molekülü sinaps boşluğundan temizlenemez ve bunun sonucu olarakta istemsiz kas hareketleri meydana gelir [27, 28].



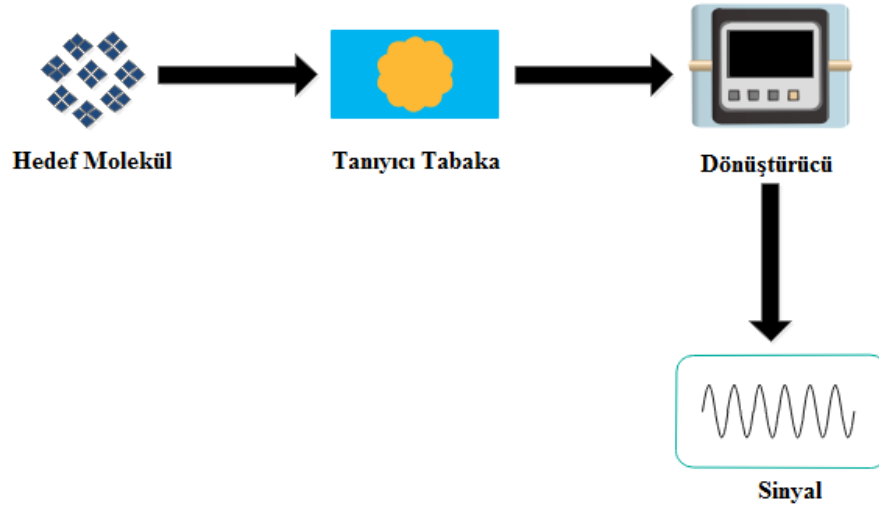
Şekil 1.11. Sinir hücrelerinde asetilkolin birikiminin şematik gösterimi

1.4. Sensörler

Belirli bir ölçülene karşı yanıt olarak kullanılabilecek veri sağlayan cihazlara genel olarak sensör denilmektedir. Sensörler fiziksel bir parametreyi uygun sinyale dönüştürürler. Sensör ve dönüştürücü terimleri genellikle birbirlerinin yerine kullanılırlar. Ancak dönüştürücüler giren enerjiyi başka bir enerji formuna dönüştüren cihazları, sensörler ise farklı enerji biçimlerini elektrik enerjisine çeviren cihazları temsil eder. Terimler arasındaki bu karışıklığı gidermek amacıyla 1969 yılında ISA(Instrument Society of America) bu iki terimi eş anlamlı kabul etmiştir. İkisini de ortak bir ifadeyle şöyle tanımlamıştır: "ölçülen fiziksel özellik, miktar ve koşulların kullanılabilir elektriksel miktara dönüştüren bir araç."

İnsan vücudu da çeşitli doğal sensörlere ev sahipliği yapmaktadır. Örneğin duyu organlarımızın her birisi birer sensör olarak düşünülebilir. Dış dünyadan alınan sinyal algılayıcı organ tarafından yakalanır, ardından dönüştürücü olarak düşünebileceğimiz beyne iletilir. Beyinden elde edilen veriler ise kas sistemi, iskelet sistemi gibi ilgili birimlere gönderilir.

Sensörler ölçüm yaptıkları çevreye göre de değerlendirilebilir. Bazı sensörler ölçüm yaparken dışardan enerjiye ihtiyaç duyarken bazıları ise enerjiye ihtiyaç duymazlar. Bu şekilde bakıldığında sensörler aktif ve pasif sensörler olarak sınıflandırılabilir. Aktif sensörler çalışılan çevreden enerji alırken, pasif sensörler enerji almazlar. Sensörlerin genel olarak çalışma prensibi Şekil 1.12’de gösterildiği gibidir.



Şekil 1.12. Sensörlerin çalışma prensibi

1.4.1. Kimyasal sensörler

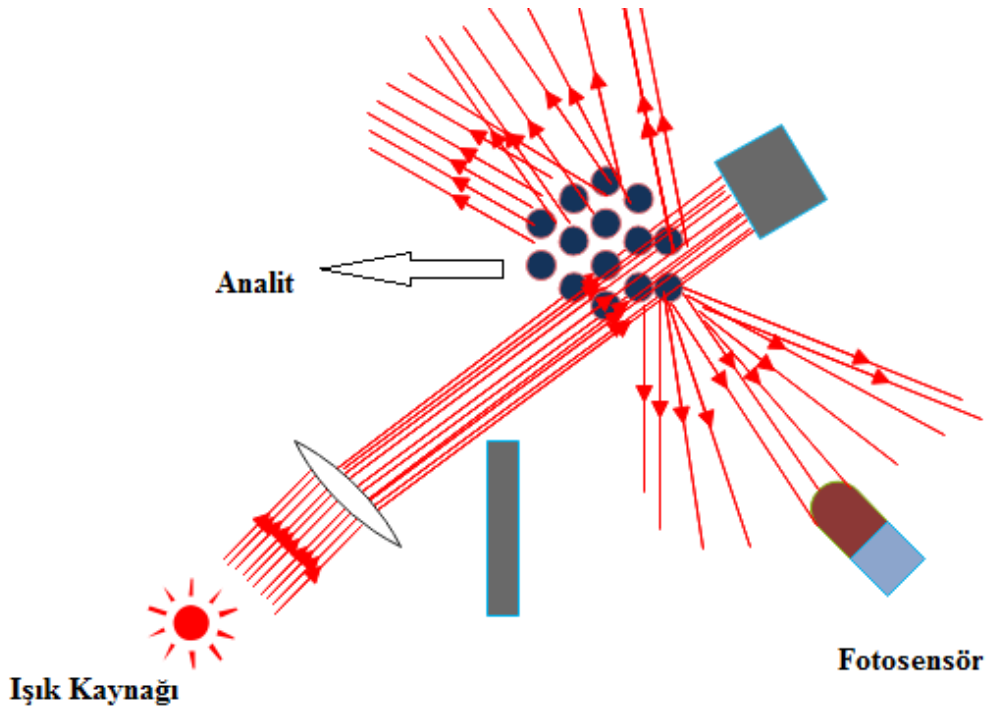
Kimyasal sensörler numune içerisindeki analitin derişimine bağı olarak elde ettikleri kimyasal bilgiyi sinyale dönüştüren sensör sistemleridir. Elde edilen kimyasal bilgi analitin sensör yüzeyinde girdiğı bir reaksiyon aracılığıyla veya ortamın değışen fiziksel özellikleri yardımıyla elde edilebilir. Kimyasal sensörlerin ortak özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

- Kimyasal sensörde bulunan algılayıcı tabaka ile hedef molekül kimyasal etkileşim halindedir.
- Ölçümden sonra algılayıcı tabakanın kimyasal özelliklerinde herhangi bir değışiklik olmamaktadır.
- Küçültülebilir olmalıdırlar.
- Diğ er analiz yöntemlerine göre daha ekonomik olmalıdırlar [29].

Kimyasal sensörler algılayıcı kısmının özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Kimyasal reaksiyonun olmadığı sadece ortamdaki fiziksel değışimlerden yararlanarak ölçüm yapılan kimyasal sensörler mevcuttur. Bu tarz kimyasal sensörlerde absorbands değışimi, refraktif indeks, iletkenlik, sıcaklık ve kütle değışimi ölçülmektedir. Analit

ortamı ile algılayıcı tabaka arasındaki reaksiyon sonucu meydana gelen değişikliklerden yararlanarak ölçüm yapılabilir. Bu sensörler kimyasal ilkeye dayalı kimyasal sensörler olarak adlandırılabilirler. Algılayıcı tabakada biyolojik bir molekülün olduğu ve meydana gelen sinyalin biyokimyasal bir süreç sonucunda elde edildiği kimyasal sensörlere ise biyokimyasal sensör denilmektedir [30].

Kimyasal sensörler dönüştürücü kısmının çalışma prensibine göre sınıflandırılabilir. Algılayıcı kısım ile numune içerisinde bulunan analit arasındaki etkileşim sonucunda optik olaylardaki değişimi anlamlı verilere dönüştüren optik cihazlar mevcuttur. Bu cihazlar; analit ile algılayıcı tabaka arasındaki etkileşim sonucunda meydana gelen absorbans değişimini, algılayıcı yüzeye analitin bağlanmasından dolayı değişen reflektansı, ortamda meydana gelen kimyasal reaksiyon sonucu oluşan limünesansı, analit ortamında meydana gelen emisyon değişiminden kaynaklı floresansı, numune ortamının değişmesiyle değişen kırılma indeksini, ışık absorpsiyonunun neden olduğu optotermal etkiyi ve numunedeki parçacıklardan oluşan saçılmayı ölçerler [31]. Optik kimyasal sensörlerde çoğunlukla optod adı verilen elektrot benzeri cihazlar kullanılır. En önemli avantajı bir referansa ihtiyaç duymamasıdır. Bu özelliğinden dolayı fiber optiklerde kullanılır. Optik sensörün çalışma prensibi en basit şekliyle Şekil 1.13’de verilmiştir.



Şekil 1.13. Optik sensörlerin çalışma prensibi

Kimyasal sensör siteminde kimyasal bir değişimi doğrudan elektrik verisine dönüştüren sensörlere elektrokimyasal sensör denilmektedir. Voltametrik sensörlerde doğru akım veya alternatif akım ortamında akım ölçümü yapılmaktadır. Voltametrik sensör grubuna inert, aktif, modifiye elektrotlar ile dışardan akım alan veya almayan sensörlerde dahildir [31]. Potansiyometrik sensörlerde, referans elektroda göre çalışma elektrodundaki potansiyel değişimi ölçülmektedir. Elektrotun daldırıldığı çözeltide bulunan analit iyonlarının elektrot yüzeyinde potansiyel oluşturması ilkesine dayanmaktadır. Oluşan potansiyel değeri çözeltideki analit iyonlarının sayısı ile orantılıdır. Kondüktometrik sensörlerde sabit voltajda bir çözeltideki reaksiyon sonucunda oluşan elektriksel iletkenlikteki değişim ölçülür.

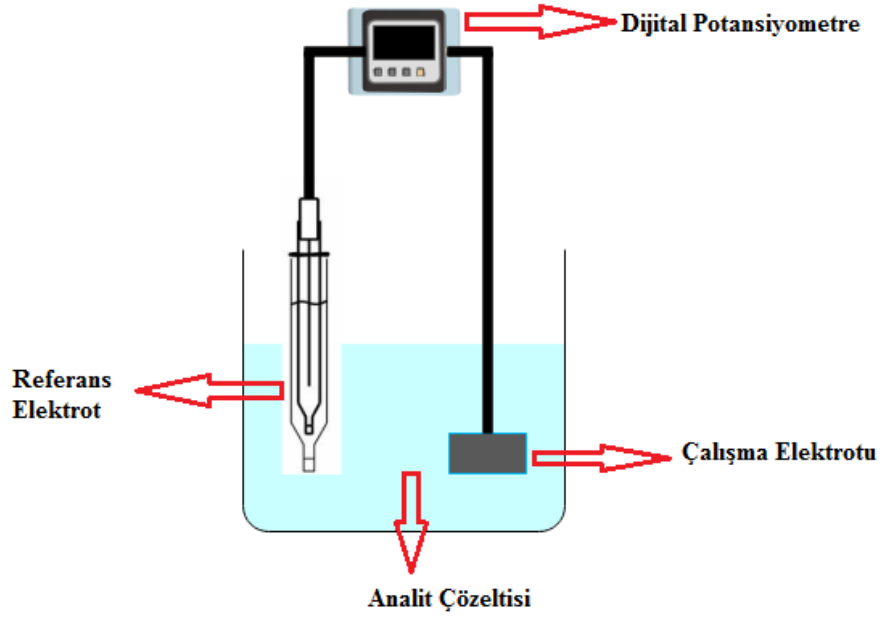
Kimyasal sensör sistemlerinde algılama biriminin bir analiti adsorplaması sonucu kütlede meydana gelen değişimin ölçümüne dayanan cihazlara kütle sensörleri denilmektedir. Aynı zamanda mikrogravimetrik sensörler olarakta bilinmektedirler. Bu tip sensörlerde elektrot biriminde kuvars gibi piezoelektrik kristaller kullanılmaktadır.

Kimyasal sensörler ölçülen büyüklüğe göre de sınıflandırılabilir. Bu şekilde sınıflandırıldığında sensör çeşitleri; mekanik, termal, elektriksel, manyetik, ışıma, kimyasal olarak sıralanabilir. Mekanik sensörlerde uzunluk, alan, miktar, kuvvet, moment, hız, ivme ölçülmektedir. Bu tip sensörlere basınç sensörleri örnek olarak verilebilir. Termal sensörlerde sıcaklık ve ısı akışı ölçülmektedir. Termal enerjiyi veya termal enerjinin etkilerine karşılık gelen bir elektrik enerjisini ölçerler. Elektriksel sensörlerde, yük, akım, potansiyel, potansiyel farkı, elektrik alanı, iletkenlik, dielektrik sabiti gibi değişkenlerden yararlanarak ölçüm yapılır. Manyetik sensörlerde manyetik alan elektrik sinyaline dönüştürülür. Bu tip sensörlere manyometre örnek olarak verilebilir. Işıma tipi sensörlerde yoğunluk, dalga boyu, polarizasyon, faz, yansıtma gibi özellik ve değişkenlerden yararlanılarak analiz yapılmaktadır. Kimyasal sensörler, kimyasal maddelerin ve derişimlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılırlar. Yoğunlaşma, içerik, reaksiyon hızı, pH miktarı gibi değişkenlerin ölçülmesine dayanmaktadır.

Kimyasal sensörlerin performansının belirlenmesinde yararlanılan parametreler şu şekilde sıralanabilir: duyarlılık, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, çalışma aralığı, seçicilik, doğrusallık, cevap süresi, kararlılık, sensör ömrü.

1.4.1.1. Potansiyometrik sensörler

Elektrokimyasal hücrelerde potansiyel ölçerek numune analizi yapılan yöntemlere genel olarak potansiyometrik yöntemler denilmektedir. Bu yöntemde sistemden akım çok az geçer veya hiç geçmez. Bu şartlar altında ortamdaki analit konsantrasyonuna bağlı olarak çalışma elektrotunun referans elektrota karşı değişen potansiyelinin ölçüldüğü sistemlerdir. Potansiyometrik analiz yapılan sistemlerin üç temel üyesi vardır. Bunlar; çalışma elektrotu, referans elektrot ve potansiyel ölçüm cihazıdır. Basit bir potansiyometri devresi Şekil 1.14’de verilmiştir.



Şekil 1.14. Potansiyometrik sistem

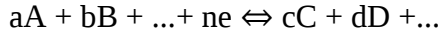
Potansiyometrik ölçüm sistemlerinde potansiyel ölçümü için potansiyometre dışında pH metrede kullanılır. Potansiyometrenin kullanılabilmesi için ölçüm sisteminin düşük dirençli olması gerekmektedir. Kullanılacak olan devre sistemi yüksek dirençli olduğunda pH metre tercih edilmektedir. Cam elektrota sahip pH metreler ile yapılan ölçümler potansiyel ölçümünü de içermektedir.

1.4.1.1.1. Potansiyometrik tayin ilkesi

Bir iyon seçici elektrotta, elektrotta bulunan iç standart çözelti ile numune çözeltisini birbirinden ayıran iyon seçici membran bulunmaktadır. Numune çözeltisinde bulunan elektronlar, basit iyonlar veya analite ait nötral ya da yüklü kompleksler seçici membranın yüzeyinden iç kısımlara doğru standart çözeltinin derişimine bağlı olarak ilerlerler. Bu olay sonucunda elektrostatik motor kuvveti (EMK) oluşur. EMK değeri

referans elektrotu ait yarı hücre ile çalışma elektrotuna ait yarı hücrelerin bir arada değerlendirilmesiyle hesaplanır.

Numune konsantrasyonu ile elektrot potansiyeli arasındaki ilişkiyi kurabilmek için öncelikle aşağıdaki tersinir yarı reaksiyon yazılır.



Verilen tersinir yarı reaksiyondan yararlanarak elektrotun potansiyel farkı (E) Nernst eşitliği ile hesaplanır [32].

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[C]^c [D]^d \dots}{[A]^a [B]^b \dots} \quad (1.1)$$

Bu denklemde; E çalışma elektrotunun potansiyelini, E^0 standart elektrot potansiyelini, R gaz sabiti değerini ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T kelvin cinsinden sıcaklık değerini, F faraday sabitini ($96486 \text{ J.volt}^{-1}$), [A], [B], [C], [D] iyon aktivitelerini, a, b, c, d yarı reaksiyonda yer alan her bir türün mol sayısını, n reaksiyon sırasında alınan verilen elektron sayısını temsil etmektedir.

Nernst eşitliğinde derişim yerine iyon aktivitesi kullanılıp, eşitlik tek bir iyon için yazılırsa aşağıdaki denklem elde edilir.

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{nF} \ln a_i \quad (1.2)$$

Denklemdeki ($\pm$) ifadesi anyonlar için (-), katyonlar için (+) olarak kullanılır. Ortamdaki iyon aktivitesinin a_1 değerinden a_2 değerine değiştiği kabul edilirse elde edilen yeni denklem aşağıdaki gibi olur.

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_2}{a_1} \quad (1.3)$$

Son elde edilen denklem logaritmik hale getirildikten sonra, ölçümlerin 25°C 'de yapıldığını kabul ederek tüm sabitlerin değerlerini yerlerine yazdığımızda aşağıdaki denklem elde edilir.

$$E = E^0 \pm \frac{0,0592}{n} \log \frac{a_2}{a_1} \quad (1.4)$$

Son elde edilen denklemden 25°C sıcaklık için potansiyel ile aktivitenin logaritmik değeri arasındaki ilişkinin değişimi n yüklü iyonlar için $59,2/n \text{ mV}$ olarak bulunur. Elde edilen bu değer katyonlar için pozitif, anyonlar için ise negatiftir.

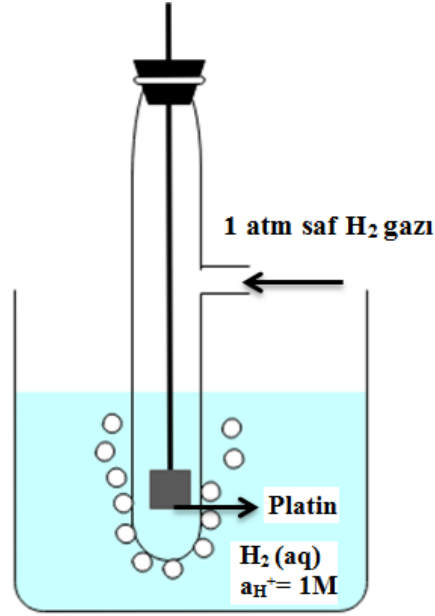
1.4.1.1.2. Referans elektrotlar

Potansiyometrik hücrede kullanılırken elektrot potansiyeli bilinen ve işlem sırasında potansiyeli değişmeden kalabilen elektrotlara referans elektrotlar denilir. Bu tip elektrotlara standart elektrotta denilmektedir. Referans elektrotun potansiyel değeri çalışılan ortama, analitin yapısına veya konsantrasyonuna bağlı olarak değişmez. Referans elektrotun potansiyel değerini etkileyen tek unsur sıcaklık değeridir. Potansiyometrik hücrelerde referans elektrot anot olarakta adlandırılabilir. İdeal bir referans elektrotun sahip olması gereken özellikler şu şekile sıralanabilir [33]:

- Referans elektrotun sabit bir potansiyel değeri olmalıdır. Bu değer numune ortamından etkilenmemeli ve zamanla değişmemelidir.
- Çözelti içerisinde küçük akımlar geçmesinden kısa süre sonra eski potansiyeline dönebilmelidir.
- Tekrarlanabilir veriler elde etmeye imkan vermeli ve nernst eşitliğine uygun hareket etmelidir.
- Kullanımı kolay olmalıdır.

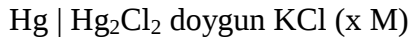
En yaygın kullanılan referans elektrotlar, referans hidrojen elektrodu, kalomel elektrot ve gümüş/gümüş klorür elektrotlardır.

Referans hidrojen elektrot en çok kullanılan referans elektrottur. En yaygın kullanıldığı yerler hücre potansiyeli ve pH ölçümleridir. Kullanılan diğer referans elektrotların standart potansiyel değerleri standart hidrojen elektrotu (SHE) karşı belirlenir. Referans olarak SHE'nin alınmasından dolayı bu elektrotu primer referans elektrotta denilmektedir. Standart hidrojen elektrotun dezavantajları ise hazırlanmasının zor olması, ortamdaki yükseltgen ve indirgen özellik gösteren maddelere karşı hassasiyet göstermesi olarak sayılabilir. Bu sebepten dolayı çok sık kullanılmazlar. Standart hidrojen elektrotun şematik olarak gösterimi Şekil 1.15'de verilmiştir.

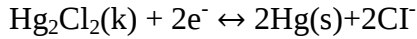


Şekil 1.15. Standart hidrojen elektrot

Kalomel elektrot referans elektrotlar arasında en çok tercih edilenidir. Bunun nedeni hazırlanış kolaylığıdır. Kalomel referans elektrot doygun civa(I) klorür ile civadan oluşur. İkiisi temas halindedir. Civa/civa klorür numune içerisindeki elektrolitle temas etmez. Bu özelliği gümüş/gümüş klorür elektrota göre ona üstünlük sağlar. Çünkü elektrolitle temas etmemesi sayesinde elektrot yüzeyi daha az kirlenir. Kalomel elektrot yarı hücresinin gösterimi şu şekildedir:



Civa/civa klorür elektrot sisteminin KCl ile doyurulması sonucunda doymuş kalomel elektrot elde edilir. Doygun KCl çözeltisinin bu elektrot sisteminde kullanılmasının nedeni klorür konsantrasyonunun sabit tutulmasının istenmesidir. Kalomel elektrotta gerçekleşen tepkime ise şu şekildedir;

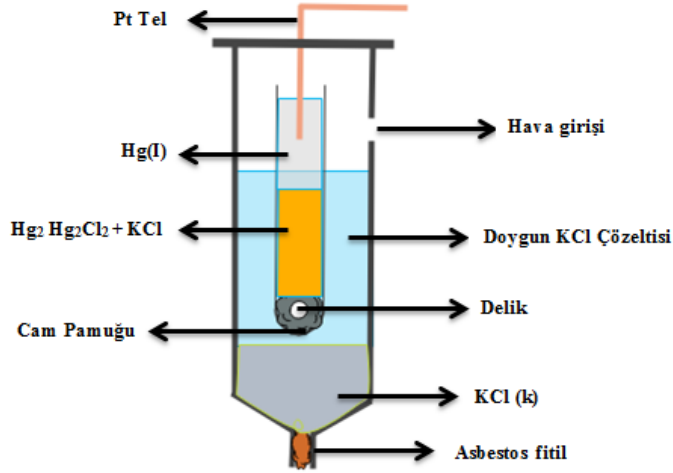


Bu reaksiyon için Nernst eşitliği yazıldığında aşağıdaki denklem elde edilmektedir.

$$E = E^0 - \frac{0,0592}{2} \log[\text{Cl}^-]^2 \quad (1.5)$$

Bu denklemden de anlaşıldığı gibi elektrotun potansiyel değeri Cl^- iyonunun derişimine bağlıdır. Kalomel elektrotta gerçekleşen reaksiyon sonucunda oluşan klor iyonu $\text{Hg}(\text{I})$ iyonu ile tepkimeye girerek ortamdaki klor iyonu derişiminin sabit

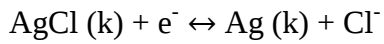
kalmasını sağlar. Böylece Nernst eşitliğine göre klor iyonu derişimi sabit kaldığından kalomel elektrotun potansiyelide sabit kalmış olur. Doygun kalomel elektrodun potansiyeli SHE'ye göre 25 °C'de 0,2444 V'tur. Kalomel referans elektrotun şematik gösterimi Şekil 1.16'da verilmiştir.



Şekil 1.16. Kalomel referans elektrot

Kalomel elektrotun sıcaklık katsayısı çok yüksektir. Bu sebeple sıcaklık değişiminden elektrot potansiyeli çok fazla etkilenmektedir. 50 °C'nin üstünde çalışılan ölçümlerde elde edilen sonuçlar sağlıklı olmamaktadır. Aynı zamanda kalomel elektrotta cıva ile çalışıldığından dolayı toksik etkisi bulunmaktadır.

Gümüş/gümüş klorür elektrot bir diğer referans elektrottur. Gümüş veya platin telin yüzeyinin gümüş klorür ile kaplanmasıyla elde edilir. Hazırlanan elektrot ile numune ortamı arasında gözenekli cam bulunmaktadır. Gümüş/gümüş klorür elektrotta meydana gelen reaksiyon şu şekildedir;

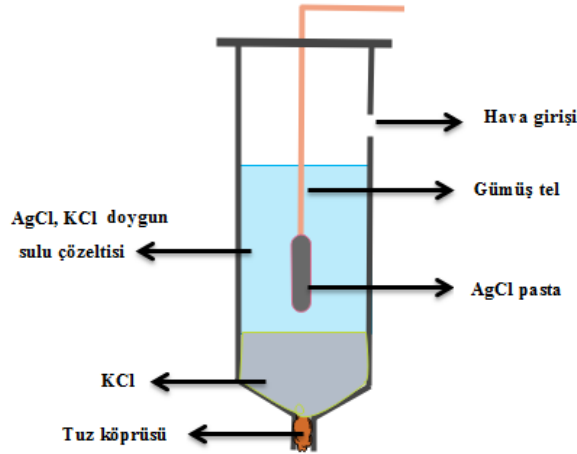


Bu reaksiyon için Nernst eşitliği yazıldığında aşağıdaki denklem elde edilmektedir.

$$E = E_{\text{Ag/AgCl}}^0 - \frac{0,0592}{1} \log[\text{Cl}^-] \quad (1.6)$$

Ag/Agcl elektrot için yazılan reaksiyona dayanarak elde edilen Nernst eşitliği göstermektedir ki elektrotun potansiyeli klorür iyonunun derişimine bağlıdır. Elektrot düzeneğinde bulunan KCl, elektrot kullanımı sırasında potansiyel değişimine karşı kullanılmaktadır. Aynı zamanda KCl'nin kullanılmasının diğer bir nedeni ise pH

ölçümlerinde girişim yapmamasıdır. Ag/AgCl elektrodun SHE'ye karşı potansiyeli 25 °C'de 0,199 V'tur. Ag/AgCl elektrodun kalomel elektroda göre avantajı sıcaklık değişiminden az etkilenmesidir. Yüksek sıcaklıklarda yapılacak analizler için bu elektrot tercih edilmektedir. Ayrıca bu elektrodun minyatürize edilmesi mümkündür. Gümüş/gümüş klorür referans elektrotun şematik gösterimi Şekil 1.17'de gösterilmiştir.



Şekil 1.17. Gümüş/gümüş klorür referans elektrot

1.4.1.1.3. İyon-seçici elektrotlar

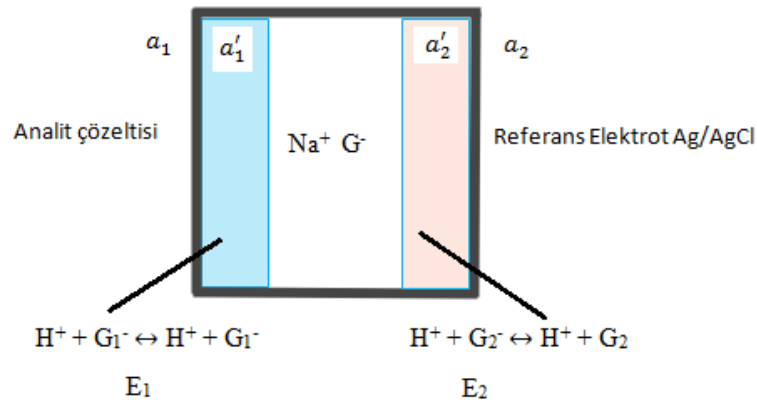
Analitin bulunduğu numune ortamında sadece analit iyonuna özgü cevap veren elektrotlara “iyon-seçici elektrotlar (ISE)” denilmektedir. İyon-seçici elektrotlarla yapılan ölçümler iyon aktifliği üzerinden yapılır. Çalışma ortamındaki toplam iyonik şiddet sabit tutulursa iyon-seçici elektrot ile konsantrasyon ölçümü yapılabilir. Hiçbir elektrot tam olarak sadece bir iyonla cevap vermez. Ancak bir iyon için bariz şekilde seçicilik gösterir.

Hedef moleküle özgü seçicilik gösteren bir elektrot geliştirebilmek için ilk olarak o moleküle seçicilik gösteren iyonofor maddelerin bulunması veya sentezlenmesi gerekmektedir. Çalışma elektrodu hazırlanırken elde edilen iyonofor madde ile elektrot yapımında kullanılan diğer maddeler uygun oranlarda birleştirilirler. İyon seçici elektrotlar potansiyometrik hücrede çalışma elektrodu olarak görev yaparlar [34] İyon seçici elektrotların sınıflandırılması şu şekilde yapılabilir [34]:

- Cam iyon-seçici elektrotlar
- Metalik (katı-hal) iyon-seçici membran elektrotlar
- Kaplama tel elektrotlar

- Sıvı-hal iyon-seçici elektrotlar
- Gaz ve enzim elektrotlar
- İyon-seçici alan etki transistörleri (ISFET)
- Kompozit elektrotlar
- Sıvı-membran iyon-seçici elektrotlar (polimer-membran elektrotlar)

Cam elektrotların en yaygın kullanım yeri pH metrelerdir. Bunun nedeni bu elektrotların hidrojen iyonuna karşı seçici olmalıdır. Cam elektrotun seçiciliğini belirleyen etken camın kimyasal bileşimidir. Cam elektrotlarda iletkenliği sağlayan iyonlar sodyum ve hidrojen iyonlarıdır. Cam elektrot numuneye daldırıldığında asitlik farkından dolayı hidrojen iyonları cam elektrotun içine nüfus ederken cam elektrottan da çözeltiye sodyum iyonu geçici olur. Cam membranda çözeltiye temas edildiğinde meydana gelen iyon değişimi Şekil 1.18’de gösterilmiştir.



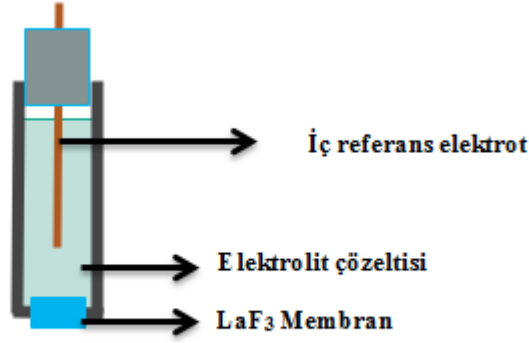
Şekil 1.18. Camın membranda meydana iyon değişimi

Cam membranın yüzeyleri arasındaki asitlik farkından dolayı bir potansiyel fark meydana gelir. Ölçülen bu potansiyel farktan yararlanarak pH metreler ortamın pH'sını hesaplarlar. Aşırı bazik ortamlarda pH 10 değerini aştığında alkali hata denilen bir ölçüm hatası meydana gelir. Bunun nedeni cam elektrotun ortamdaki sodyum ve potasyum iyonlarına karşı aşırı hassasiyet göstermesidir. Aşırı asidik ortamlarda ise pH değeri olması gerekenden daha düşük bir değerde okunur. Bu duruma ise asit hatası denilmektedir.

Bahsedilen hataların azaltılması için elektrotta kullanılan camın bileşiminde değişiklikler yapılabilir. Cam kompozisyonu değiştirilerek hidrojen iyonu dışında başka

iyonlara da seçicilik gösteren camlar elde edilmiştir. Bu iyonlara Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ ve Cs^+ örnek olarak verilebilir.

Metalik indikatör elektrotlarda en çok kullanılan platin elektrottur. Çünkü platin inert bir metaldir. Platin elektrot çözelti içerisinde elektron alış-verişine olanak sağlamaktadır. Bu tarz elektrotlarda kullanılan katı metalik madde iyon seçici membran gibi davranır. Elektrotun analite olan duyarlılığı iyonun membran matriks kapasitesine bağlıdır [34]. Örnek bir katı-hal tipi iyon seçici elektrot Şekil 1.19’da verilmiştir.

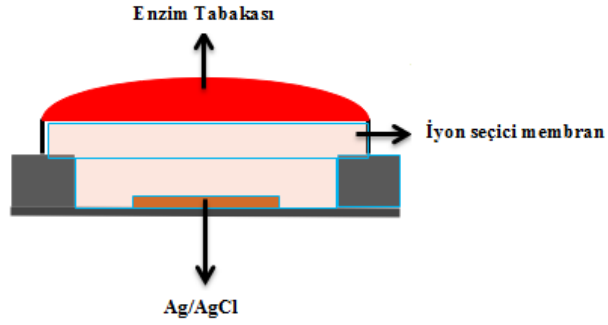


Şekil 1.19. Katı-hal tipi iyon seçici elektrot

Kaplama tel elektrotlar adından da anlaşıldığı üzere telin üzerine kaplama yapılarak hazırlanırlar. Kaplama maddeleri numune ortamında aşınmamaları için az çözünen tuzlardan seçilirler. Gümüş tuzları çözünürlüklerinin düşük olmaları sebebiyle kaplama maddesi olarak sık sık kullanılırlar.

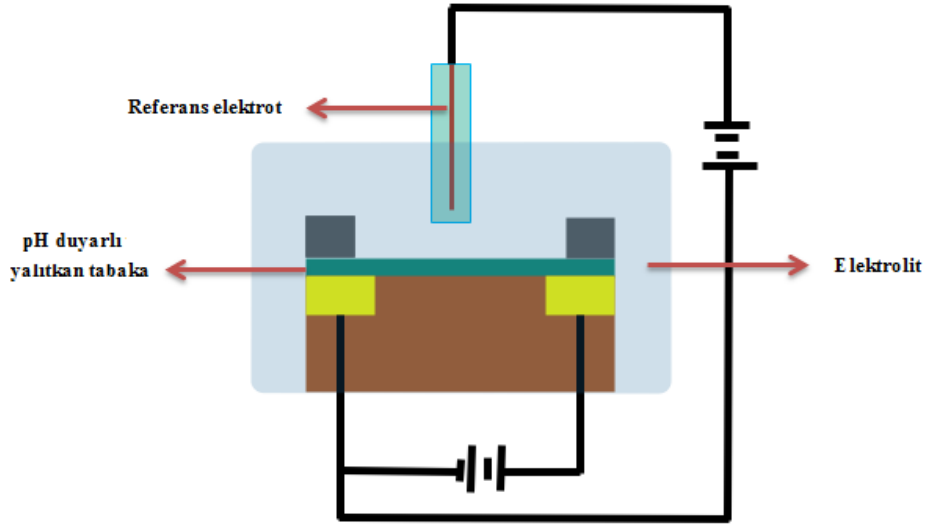
Sıvı hal iyon-seçici elektrot elde etmek için öncelikle iyon değiştirme özelliğine sahip organik moleküller çözülerek viskoz sıvı elde edilir. Elde edilen bu sıvı iyon değiştirici tabaka olarak kullanılır. Bu elektrotlar çok küçük hacimdeki numunelerin analizini yapabilecek şekilde minyatürize edilebilirler. Böyle hazırlanan elektrotlara iyon-seçici mikroelektrotlar denilmektedir [35].

Enzim elektrotlarında kullanılacak olan enzim membran yüzeyine immobilize edilir. Hedef molekülün reaksiyonunun enzim tarafından katalizlenmesi veya enzime özgü substratın bağlanması presibine göre ölçüm yapılır. Potansiyometrik enzim elektrotun basit bir gösterimi Şekil 1.20’de sunulmuştur.



Şekil 1.20. Potansiyometrik enzim elektrot

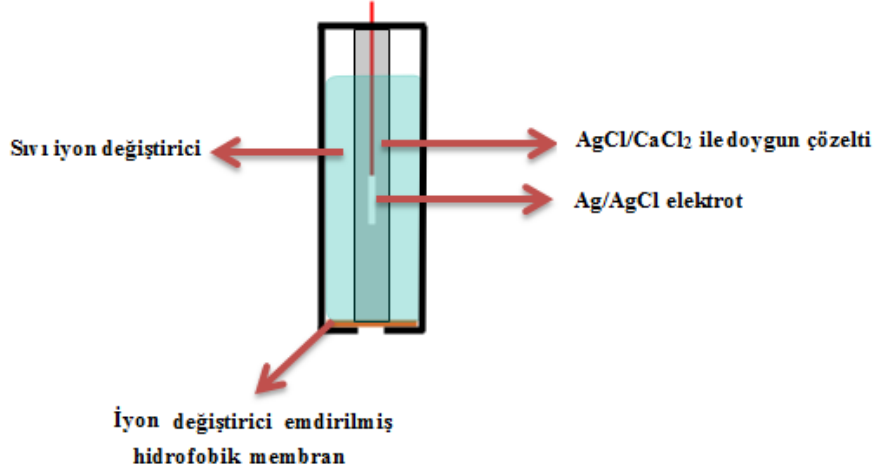
Son yıllarda ilerleyen teknoloji ile birlikte iyon-seçici elektrotların minyatürize edilmesi konusuna ilgi artmıştır. Bu nedenle çok sayıda iyon karşı seçicilik özelliğine sahip iyon-seçici alan etki transistörleri (ISFET) geliştirilmiştir. Bu tip elektrotlar boyutlarının küçük olması, dayanıklı olma, aşırı çevre şartlarında çalışabilme, çabuk cevap süresi gibi üstünlüklere sahiptirler. Çok çeşitli alanlardaki analizler için kullanılabilmektedirler. ISFET elektrotun çalışma prensibi Şekil 1.21’de gösterilmiştir.



Şekil 1.21. ISFET elektrodu

Sıvı esaslı iyon-seçici elektrotlarda ölçüm yapılabilmesi için elektrotun iç ve dış yüzeyinde iyon değişim dengesi kurulmalı ve potansiyel ölçümü yapabilmek amacıyla elektrot sisteminin düşük değerdeki bir akımı geçirebilmesi gerekmektedir.

Bu açıdan incelendiğinde cam elektrot ile aynı prensibe sahiptir. Cam elektrotta hareket halindeki iyon hidrojen iken burada ise farklı anyon ve katyonlar kullanılabilir. Bu elektrotta kullanılan iyon değiştirici hidrofobik membrana emdirilmiş bir sıvıdır [36]. Sıvı-membran iyon seçici elektrotun şematik gösterimi Şekil 1.22’de verilmiştir.



Şekil 1.22. Sıvı-membran iyon seçici elektrod

Potansiyometrik sensörlerin; aşırı çalışma koşullarında kullanılabilmesi, cevap süresinin kısa olması, anyon ve katyonların analizlerini yapabilmesi, kararlı olmaları olumlu yönleri olarak sayılabilir. Olumsuz yönleri ise; analizlerin ölçüm kesinliğinin çok yüksek olmaması, iyon girişimine karşı hassasiyet göstermesi, numune ortamında elektrotun seçici yüzeyinin kirlenmeye maruz kalabilmesi, çalışma ortamının iyonik şiddetinden çok fazla etkilenmesidir.

İyon-seçici elektrotların çalışma performansını etkileyen faktörler şu şekilde sıralanabilir:

- Cevap zamanı
- Tayin limiti
- Seçicilik
- Tekrarlanabilirlik
- Doğrusal çalışma aralığı
- Kullanım ömrü
- pH aralığı

Seçicilik; iyon-seçici elektrotun numune ortamında sadece hedef iyonla özgü cevap verebilme kabiliyetidir. Ancak iyon-seçici elektrotlar tam anlamıyla sadece bir

iyona duyarlı değildir. Ortamdaki diğer iyonlara karşıda cevap verebilmektedirler. Numune çözeltisinde bulunan diğer iyonların iyonik şiddeti etkilemeleri ve girişim yapmaları nedeniyle elde edilen ölçüm sonuçları sağlıklı olabilmektedir.

Seçicilik kavramı ilk olarak Nicolsky tarafından denklem üzerinden açıklanmıştır. Bu denklemi elde etmek için cam elektrotun sodyum ve hidrojen iyonlarına karşı sergilediği duyarlılıktan yararlanılmıştır [37].

$$E = E^0 + \frac{0,0592}{n} \log a_x + \sum k_{x,y}^{pot} a_y^{n_x/n_y} \quad (1.7)$$

Bu denklemde a_x ölçülen iyonun aktivitesini, a_y girişim yapan iyonun aktivitesini, n_x ve n_y ortamda bulunan iyonların yükünü, $k_{x,y}^{pot}$ ise seçicilik katsayısını göstermektedir.

Verilen bu denklem hazırlanan elektrotun hedef iyon ve ortamdaki diğer iyonlara karşı hassasiyetini yorumlamaya olanak sağlamaktadır. Denklemdaki x alt indisi hedef iyonu, y alt indisi ise diğer iyonları temsil etmektedir. Elektrodun ortamdaki diğer iyonlara olan hassasiyetini belirleyen ise seçicilik katsayısıdır.

$$k_{x,y}^{pot} = \frac{a_x}{a_y^{n_x/n_y}} \quad (1.8)$$

Denklemden verilen seçicilik katsayısının değeri arttıkça hazırlanan elektrotun analite olan seçiciliği azalmaktadır. Seçicilik katsayısı üç farklı şekilde hesaplanmaktadır. Bunlar; ayrı çözelti yöntemi, analit iyonunun girişim yapan iyonla ait çözeltiye eklenmesi, girişim yapan iyonun analit çözeltisine eklenmesidir.

İyon-seçici elektrotlarla yapılan çalışmalarda cevap süresini belirleyen, elektrot yüzeyindeki tanıma tabakası ile numunedeki hedef iyon arasındaki dengenin oluşumudur. Cevap süresini kısaltmak için; numune karıştırmaya tabii tutulabilir, elektrot yüzeyinin kirlenmesi önlenir, analizler esnasında analize düşük konsantrasyondaki analit çözeltisinden başlanabilir.

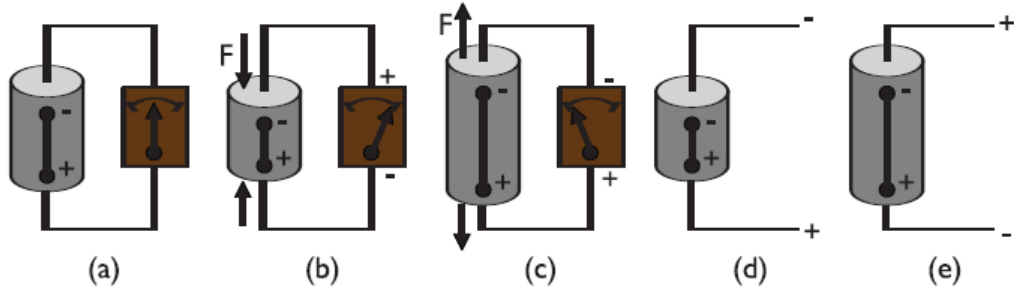
1.4.1.2. Kütle hassas sensörler

Kütle hassas sensörlerde; algılayıcı molekülün analit ile etkileşmesi sonucunda meydana gelen kütle değişiminin ölçülmesine göre analiz yapılmaktadır. Mikrogravimetrik sensörler olarakta adlandırılabilirler. Piezoelektrik kristallerin kullanıldığı türlerinde rezonans frekansındaki değişimden yararlanarak kütle değişimi ölçülür. En yaygın kullanılan piezoelektrik kristal kuvarstır.

1.4.1.2.1. Piezoelektrik etki

Piezoelektrik etki; bir kristale basınç uygulandığında, uygulanan kuvvetle orantılı olarak elektriksel gerilim oluşmasına denilmektedir. Bu etkiye sahip kristal malzemelerden en yaygın kullanılanı kuvarstır. 1880 yılında Paul Jaques Curie ve Pierre Curie kuvars kristalini kullanarak piezoelektrik etkiyi ilk olarak keşfetmişlerdir. Kuvars kristalini bir elektrik devresine bağlamışlar ve kristalin yüzeyine belirli bir miktarda basınç uygulamışlardır. Bu basınç sonucunda moleküler titreşimler ile elde edilen elektrik potansiyelini ölçerek piezoelektrik etkiyi ortaya koymuşlardır.

Piezoelektrik kristallere basınç uygulandığında, kristal içindeki atomlar o esnadaki konumlarından deforme olmuş konumlarına geçerler. Buradan da tekrar eski orijinal haline dönerler. Bu döngü piezoelektrik döngü olarak ifade edilir. Bu döngünün birim zamanda tekrarlanma sayısına ise kristalin rezonans frekansı denilmektedir. Piezoelektrik kristallerde bulunan pozitif ve negatif yüklü iyonlar titreşim sonucunda polarizasyon oluşturur. Burada oluşan salınım frekansına karşılık gelen bir elektrik alanı meydana gelir. Salınım yönü, kristalin elektrik alanındaki oryantasyonuna, kristalin oryantasyonu ise kristalin kesme yönüne bağlıdır. Ayrıca kristalin rezonans frekansı; boyut, yoğunluk gibi kendi fiziksel özelliklerine de dayanmaktadır [38]. Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi Şekil 1.23’de gösterilmiştir.

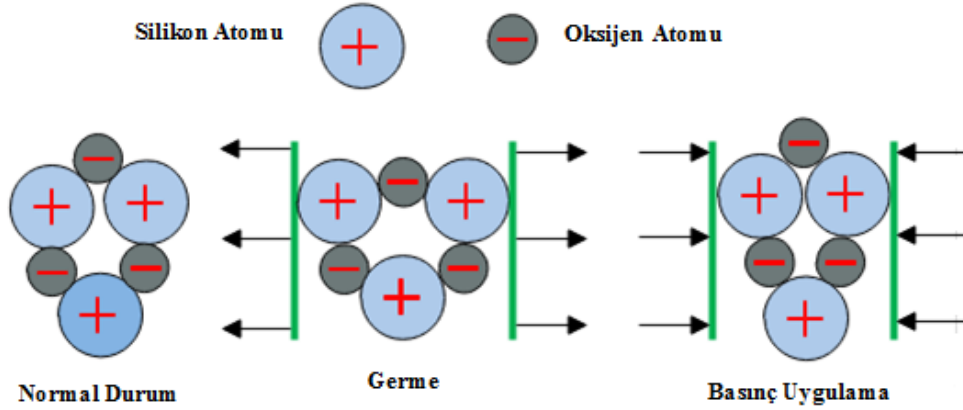


Şekil 1.23. Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi, (a) kristalin mekanik baskı veya elektrik potansiyel uygulanmamış hali (b) mekanik baskı ile sıkıştırılan kristalin pozitif potansiyel üretimi (c) mekanik olarak çekilen kristalin negatif potansiyel üretimi, (d) uygulanan negatif potansiyel ile kristalin sıkışması, (e) uygulanan pozitif potansiyel ile kristalin uzaması.

Kaynak: Çiçek, 2014, s.54

Kuvars kristali ilk olarak 1823 yılında Jöns Jakob tarafından bulunmuştur. Yapısında silikon ve oksijen bulunmaktadır. Kimyasal formülü SiO_2 'dir. Analizlerde en

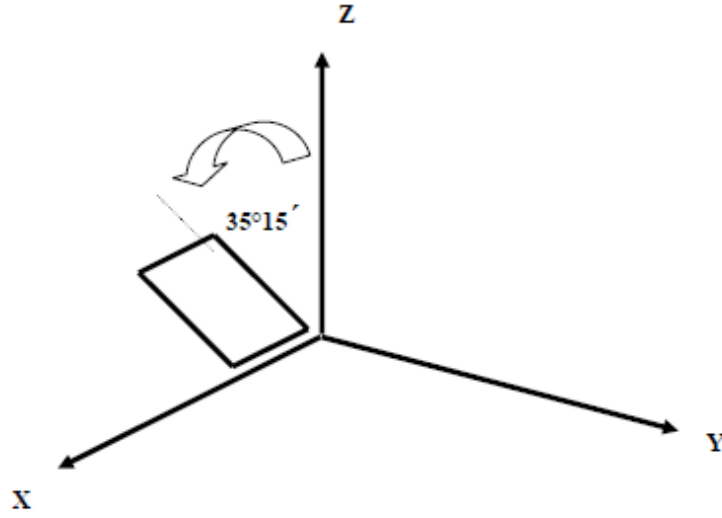
çok tercih edilen piezoelektrik malzemedir. Kuvars kristali simetrik bir yapıya sahip değildir. Bundan dolayı oksijen ve silikon atomları hareket edebilirler. Bundan dolayı bir gerilmeye tabii tutulduğunda elektriksel polarizasyona uğramaktadır. Kuvars kristalleri, diğer piezoelektrik etki gösteren malzemeler gibi kendine özgü bir titreşim frekansına sahiptir. Kuvars kristal üzerindeki piezoelektrik etki Şekil 1.24’de verilmiştir.



Şekil 1.24. Kuvars Kristali üzerindeki piezoelektrik etki

Kuvars çok ince kesilir ve iki yüzüne termal buharlaştırma yoluyla altın, gümüş, nikel, alüminyum, platin gibi metallerin kaplanmasıyla elektrotları hazırlanır. Yaygın olarak inert (aktif olmayan) olmaları nedeniyle altın elektrotlar tercih edilir. Kristalin çalışma frekans seviyesi, depozite edilen metal miktarıyla da ayarlanmaktadır. Piezoelektrik uygulamalarında kullanılan kristaller; 10-16 mm boyutlarında, yaklaşık 0.15 mm kalınlığında, disk, kare veya dikdörtgen şeklinde olmaktadır [39].

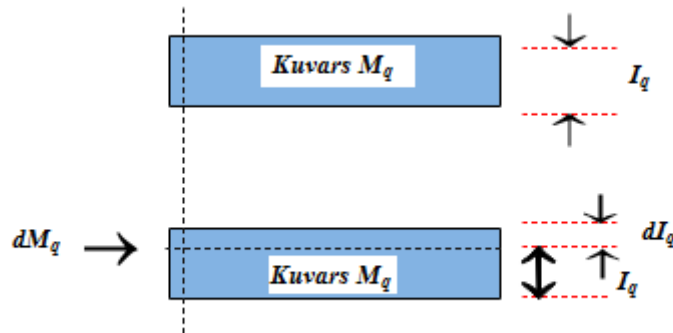
Kuartz kristallerin sensör uygulamalarında kullanılmaları için Y- kesme ailesine bağlı AT- kesme ve BT- kesme kristaller kullanılmaktadır. AT- kesmede, kuartz tabaka, z ekseninden $+35^{\circ}15'$ açıyla, BT- kesmede ise z ekseninden $-49,00^{\circ}$ açıyla kesilmiştir. AT kesme kristallerde sıcaklık katsayısı, kesme şeklinden dolayı 10-50 °C aralığında 1 ppm/°C civarında sıfıra oldukça yakındır ve bu da kristalin geniş bir frekans aralığında rezonans frekansının kararlı olarak kalmasına olanak tanır [40]. AT-kesim kuvars kristal düzleminin şematik gösterimi Şekil 1.25’de verilmiştir.



Şekil 1.25. AT-kesim kuvars kristal düzlemi

1.4.1.2.2. Sauerbrey eşitliği

Piezoelektrik etkiden faydalanarak kütle ölçümü için bağıl boşluk ve rezonans frekans ile kütle artışı arasında bir ilişkinin matematiksel olarak geliştirilmesi gerekmektedir. Önceleri bu ilişki sadece nitel olarak açıklanabilmekteydi. 1959 yılında Sauerbrey kuvars kristal bir rezonatörün frekans boşluğunun eklenen kütle ile orantılı olduğunu ortaya koymuştur. Bu sayede çok küçük kütledeki numunelerin ölçülmesinin önü açılmıştır. Kuvars plakada meydana gelen kütle artışı rezonans frekansında düşüşe neden olmaktadır [41].



Şekil 1.26. Kuvars kristal mikroterazinin basitleştirilmiş bir modeli

Şekil.1.26’da M_q kütlede ve I_q kalınlığa sahip bir kuvars kristalin çalışma şekli gösterilmiştir. Kuvars kristal levhasının salınım yapması için rezonans frekansı şu şekilde tanımlanmaktadır [41]:

$$f_q = \frac{V_q}{\lambda_q} = \frac{V_q}{2I_q} \quad (1.9)$$

Eşitlik (1.9)’da geçen f_q rezonans frekansını, V_q dalga hızının kırılmasını, λ_q dalga boyunu temsil eder ve değeri $2I_q$ ’ya eşittir. Piezoelektrik kristalin kalınlığındaki küçük bir değişim (dI_q), titreşim frekansında kaymaya (df_q) neden olmaktadır.

$$\frac{df_q}{f_q} = - \frac{dI_q}{I_q} \quad (1.10)$$

M_q kütleli kuvars kristal için dM_q kütle değişimi aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\frac{df_q}{f_q} = - \frac{dM_q}{M_q} \quad (1.11)$$

Eşitlik (1.10) ve (1.11)’in birleştirilmesiyle eşitlik (1.12) elde edilir.

$$\Delta f_q = \left(\frac{2f_q^2}{\rho_q} \right) \frac{\Delta M_q}{A} \quad (1.12)$$

Son eşitlikte geçen Δf_q frekans değişimini, f_q değişiklikten önceki rezonans frekansını, ΔM_q kütle değişimini, A osilasyon altındaki kuvars düzlemin alanını, ρ_q kuvarsın yoğunluğunu göstermektedir.

Kuvars kristaller sıcaklık değişiminden önemli ölçüde etkilenmektedir. Sıcaklık değişimiyle birlikte kristale ait fiziksel sabitlerde değişiklikler olmaktadır. Farklı üretim teknikleriyle üretilen ve farklı kesit alanlarına sahip kristallerin sıcaklık değişimine karşı gösterdikleri tepkiler aynı olmamaktadır. Bu sayede kendine özgü sıcaklık özelliklerine sahip kuvars kristal rezonans cihazları geliştirmek mümkün olmaktadır [41, 42].

Sıcaklık değişimiyle birlikte değişen rezonans frekansının kristallografik yönelmeye bağlı olduğu ortaya konmuştur. AT-kesimli kuvars kristalinin rezonans frekansı oda sıcaklığında sıcaklık değişimlerinden çok az etkilenmemektedir. Aşağıda verilen tabloda AT-kesimli kuvars kristalin frekans kaymasının sıcaklık değişiminden nasıl etkilendiği verilmiştir [41].

Tablo 1.3. Sıcaklık değişimiyle kuvars kristaldeli frekans kayması

T (°C)	$\Delta f / f$ (ppm)
20	0
30	0
60	4
80	18
100	45

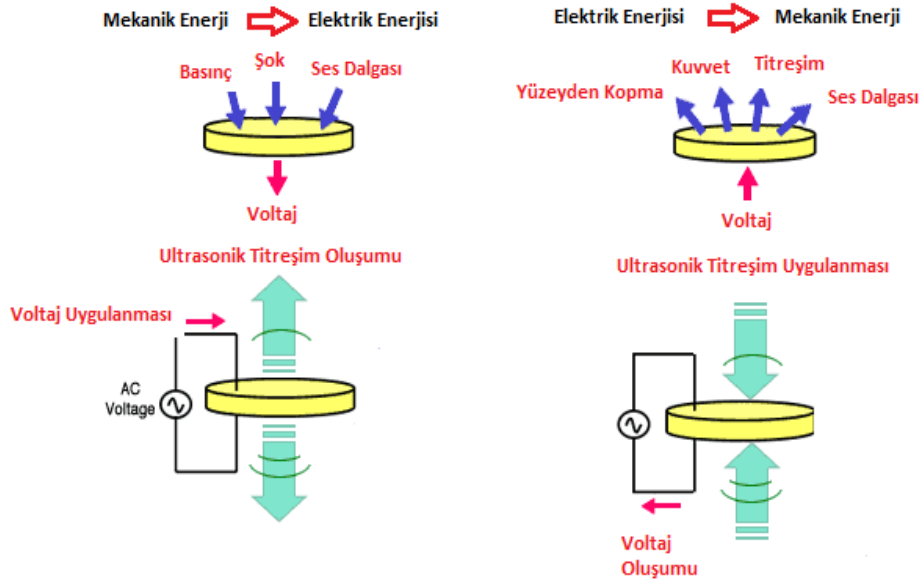
1.4.1.2.3. Kuvars kristal mikroterazi

Kuvars kristal mikroterazi (QCM) piezoelektrik kristal olarak kuvarsı kullanan, kütle değişimleri elektrik sinyaline dönüştüren bir sistemdir. Hassasiyeti oldukça yüksektir. Kullanımı 18. yüzyıla kadar dayanmaktadır. Bu cihazlar elektrokimyasal işlem esnasında oluşan çok küçük kütle değişimlerini rezonans frekansında kaymaya dönüştürürler. QCM’de kullanılan kuvars kristallerin kesit alanları değiştirilerek farklı kayma modlarında cihazlar elde edilebilmektedir. En yaygın kullanılan kesit ise; AT-kesim metodu ile elde edilen kuvars kristalidir. Bu kristal elde edilirken kuvars Z-ekseninde 35°’lik açıyla kesilir [41, 43].

QCM cihazının parçaları; kuvars elektrot, osilatör ve frekans sayıcıdır. QCM üzerine bir elektrik alan meydana getirildiğinde rezonans modunda salınım meydana gelmektedir. Sistemdeki kütle değişimine karşı hassasiyet kristalin toplam kütlesi üzerinde meydana gelen titreşim frekansına bağlı olarak ortaya çıkar. QCM cihazı üzerinde elektronik devreye bağlı olarak bulunan rezonatör numune çözeltisi ile temas ettiğinde kütle değişimine paralel olarak titreşim frekansında değişim meydana gelir. Kütle ile frekans değişimi arasındaki ilişki Sauerbrey eşitliği yardımıyla belirlenmektedir.

QCM cihazında iki adet kuvars kristal bulunmaktadır. Bunlardan birisi referans, diğeri ise örnek olarak kullanılmaktadır. Sisteme elektrik akımı uygulandığında kristaller 15 MHz’lik rezonans frekansına ulaşırlar. Referans elektrot ile örnek elektrot arasında 1 kHz’lik frekans farkı vardır. Kullanılan kristaller elektrik iletkenliği için metal ile kaplanmıştır. En çok tercih edilen metaller altın ve gümüşdür. Hazırlanan elektrot numune çözeltisi ile etkileştirildiğinde elektrot yüzeyinde analit birikimine paralel olarak rezonans frekansında değişim meydana gelmektedir. Sauerbrey eşitliği

üzerinden frekans değişimi kütle değişimine dönüştürülür. Kuvars mikro terazinin çalışma prensibi şematik olarak Şekil 1.27’de verilmiştir.



Şekil 1.27. Kuvars mikro terazinin çalışma prensibi

QCM yönteminde kullanılan elektrotun yüzeyi analite özgü tanıma tabakasıyla ince bir film halinde kaplanır. Bu şekilde kaplanan elektrodun yüzeyinde biriken analitin meydana getirdiği kütle artışından yararlanılarak analiz yapılır. QCM için kullanılan kuvars elektrot Şekil 1.28’te gösterilmektedir.



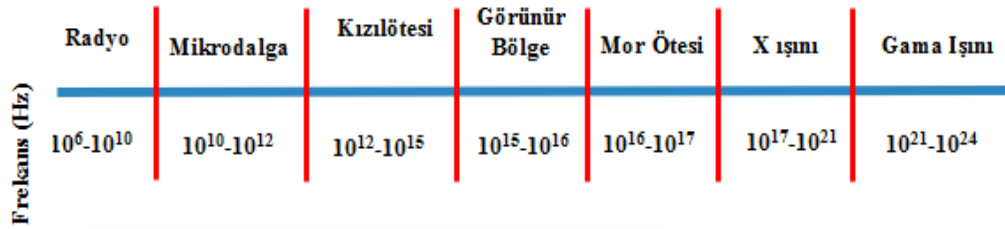
Şekil 1.28. Kuvars kristal elektrot

QCM ile ilk olarak yapılan çalışmalarda elektrot yüzeyine seçici olmayan şekilde bağlanan kütlelerin algılanması yapılmaktaydı. İlerleyen yıllarda hedef molekülün elektrot yüzeyine bağlanması amacıyla elektrot yüzeyi algılayıcı malzemelerle

kaplanmaya başlanmıştır. Bu şekilde sistem kimyasal bir sensör olarak kullanım alanı bulmuştur. QCM ile kütle ölçümü dışında da çalışmalar yapmak mümkündür. Sıvı örnekler içinde yapılan çalışmalarda sıvının yoğunluğu ve viskozitesi rezonant davranışı etkileyeceğinden dolayı yoğunluk, elastikiyet ve viskozite gibi ölçümlerde de kullanılabilirler [44].

1.5. Floresans Spektroskopisi

Işın bir elektromanyetik dalga türüdür. Elektromanyetik dalga boşlukta ışık hızıyla hareket eden bir enerjidir. Işının elektrik ve manyetik olarak iki vektörü bulunmaktadır. Elektromanyetik spektrum bölgeleri Şekil 1.29’da verilmiştir.



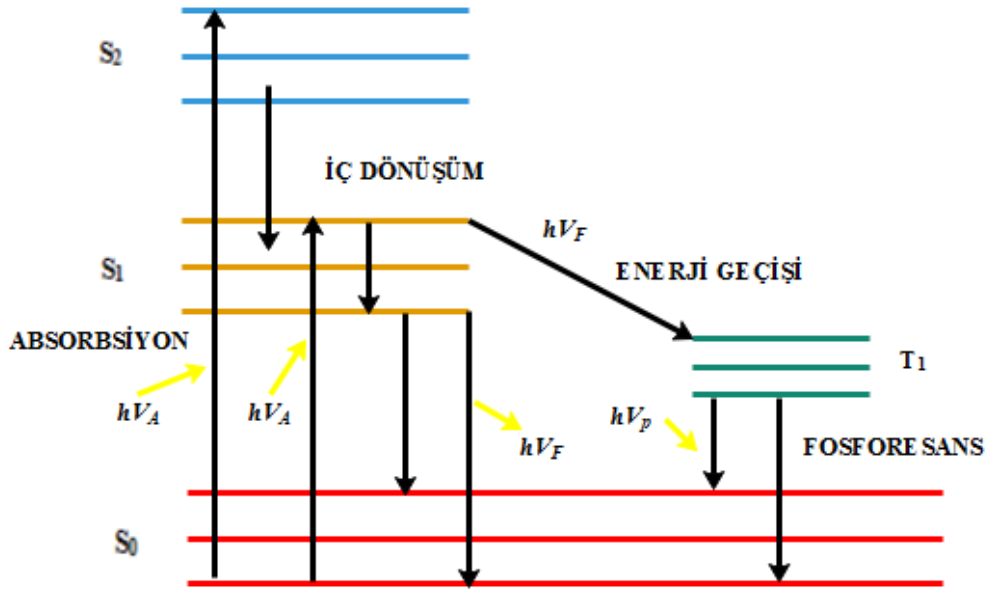
Şekil 1.29. Elektromanyetik spektrum bölgeleri

Bir atom veya molekülün absorpladığı ışını, gelen dalga boyunda veya daha uzun bir dalga boyunda geri vermesine fotolüminesans denilmektedir. Fotolüminesans iki şekilde gerçekleşir. Bunlar:

- Floresans
- Fosforesans

Maddelerin floresans özelliğinden yararlanarak yapılan analize floresans spektroskopisi denilmektedir.

Işığın madde ile etkileşmesi sonucu meydana gelen absorpsiyon ve emisyon olayını Alenander Jablonski kendi soyadını verdiği Jablonski diyagramı ile açıklamıştır. Jablonski diyagramı Şekil 1.30’da gösterilmiştir. Diyagramda elektronik enerji seviyeleri S_0 , S_1 ve S_2 olarak gösterilmiştir. Bu seviyeler sırasıyla temel, birinci ve ikinci elektronik enerji seviyelerini temsil etmektedir. Elektronik enerji seviyelerindeki her bir basamak titreşim enerji seviyesini temsil etmektedir.

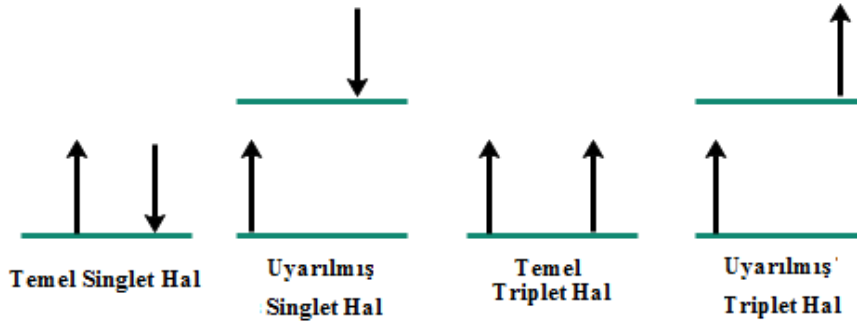


Şekil 1.30. Jablonski Diyagramı

Uyarılmış molekülün yüksek elektronik enerji seviyesinin düşük titreşimsel basamağından, bir alt elektronik enerji seviyesinin yüksek titreşimsel basamağına geçişine iç dönüşüm denilmektedir. Moleküllerin uyarıldıkları triplet enerji seviyelerinden temel enerji seviyesine inerkenki yaydıkları ışına ise fosforesans denilmektedir.

Bir molekülün iç enerjisi, moleküle ait elektronik, titreşimsel ve dönme enerjilerinin toplamına eşittir. Elektronik enerji seviyeleri bir seri titreşimsel enerji seviyesinden meydana gelmektedir. Titreşimsel seviyeler ise aynı şekilde dönme seviyelerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadırlar. Moleküller uyarılmadıklarında yani normal şartlar altında temel elektronik halin en düşük titreşimsel seviyesinde bulunduğu varsayılmaktadır.

Moleküllerin titreşim enerji seviyelerinde spinleri birbirine ters halde olan elektron çifti bulundurmasına singlet hal denilmektedir. Elektronların birbirleriyle aynı spine sahip oldukları durum ise triplet hal olarak adlandırılmaktadır. Singlet ve triple halin gösterimi Şekil 1.31’de verilmiştir.



Şekil 1.31. Singlet ve triplet hal

Molekül tarafından ışık absorplandıktan sonra temel elektronik enerji seviyesindeki elektronlardan üst enerji seviyelerine geçişler meydana gelir. Elektronun uyarılan singlet halin en düşük titreşim seviyesinden temel haldeki enerji seviyesine geçişte yaydığı enerjiye floresans denilmektedir.

Floresans spektroskopisi çok geniş bir alanda kullanılan bir spektroskopik tekniktir. Bu teknikte molekülün yapısı ile alakalı ayrıntılı bilgi elde edilemez. Ancak biyomoleküllerin yapısal ve dinamik özellikleri ile ilgili yüksek hassasiyette ve kesinlikte bilgi vermesinden dolayı kullanımı yaygınlaşmıştır. Absorbans temelli analiz yöntemleriyle kıyaslandığında tayin limiti oldukça düşüktür [45].

1.5.1. Floresansı etkileyen faktörler

Floresansı etkileyen faktörler şu şekilde sıralanabilir;

- Molekül yapısı
- Yapısal rijidite
- Sıcaklık ve çözelti
- pH
- Ortamdaki oksijen
- Işının dalga boyu ve şiddeti
- Konsantrasyon

Floresans özelliğini en fazla gösteren moleküller aromatik özellik gösteren halkalardır. Çünkü aromatik halkalarda $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri olmaktadır. Aromatik halkaların haricinde yapısında konjuge çift bağ içeren yapılarında floresans özelliği vardır. Bunlara karbonil grubu içeren moleküller örnek olarak gösterilebilir. Yapılarında azot içeren heterosiklik halkalarda uyarılmış singlet halden uyarılmış triplet hale dönüşmektedir.

Uyarılmış triplet halden temel seviyeye dönüşte fosforesans meydana gelmektedir. Benzen halkasına farklı gruplar bağlandığında floresans şiddetinde değişimler meydana gelmektedir. Benzene karboksil veya karbonil gruplarından birisi bağlandığında floresans özelliği azalmaktadır [45].

Moleküllerin rijit özellik göstermesi floresans özelliğini arttırmaktadır. Şelat komplekslerinin oluşumu rijiditeyi arttıran bir faktördür. Moleküllerde rijidite arttığında iç dönüşüm zorlaşmakta ve ışımasız olarak enerji kaybı riski azalmaktadır.

Sıcaklık artışı moleküllerde çarpışmayı arttıracığından dolayı floresans özelliği artmaktadır. Çözücülerin viskozite etkisi sıcaklıkla ters orantılıdır. Viskozite arttığında çarpışma oranı azalacağından dolayı floresans azalmaktadır. Numune hazırlanırken seçilecek olan çözücüde floresansı etkilemektedir. Özellikle polar çözücüler kullanıldığında floresans artmaktadır. Bunun nedeni polar çözücü varlığında $n \rightarrow \pi^*$ geçişindeki enerji farkının artmasıdır.

Yapısında asidik veya bazik gruplar içeren moleküllerin floresans özelliği pH değişiminden etkilenmektedir. Bundan dolayı bu tür moleküllerin çözücü ortamında iyonlaştıktan sonraki formu ile iyonlaşmadan önceki formunun floresans özelliği fark etmektedir. Ayrıca numune çözeltisi içerisinde çözünmüş halde oksijen bulunması da floresansı olumsuz yönde etkilemektedir. Çünkü oksijen molekülü paramanyetik özellik göstermektedir.

Floresans şiddeti analit konsantrasyonu ile orantılıdır.

$$F = K'(P^0 - P) \quad (1.13)$$

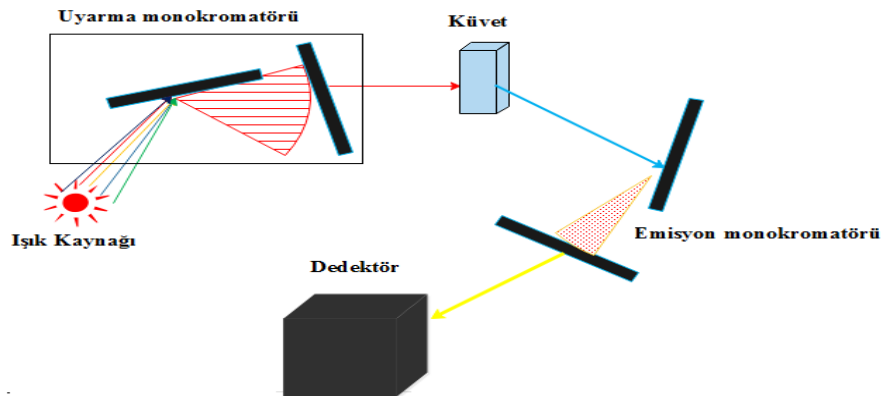
Verilen eşitlikte F, floresans şiddetini, K, kuantum verimini, P^0 , floresans özelliği gösteren molekülün üzerine düşen ışık demetinin şiddetini, P, ışın demetinin çözeltide 1 cm yol aldıktan sonraki şiddetini temsil etmektedir. Floresans özelliği gösteren maddenin absorpsiyonu şayet 0,05'den küçük ise floresans konsantrasyon ile artmaktadır. Aksi durumda ise konsantrasyon artışı ile floresans şiddetinin artışı doğrusallıktan sapar ve aşağı doğru bir eğilim görülür. Bunun iki sebebi vardır. Birincisi kendi kendini söndürmedir. Floresans molekülleri kendi aralarında etkileşime girerek enerji kaybına sebebiyet verirler. İkinci neden ise kendi kendine absorpsiyondur. Moleküller tarafından yayılan ışınlar diğer moleküller tarafından emilir ve sonuç olarak floresans azalır [45].

1.5.2. Floresans spektrometre

Floresans spektrometre cihazını oluşturan birimler şu şekilde sıralanabilir;

- Arc lamba yuvası
- Ayarlanabilir slitler
- Uyarma monokromatörü
- Örnek kompartmanı
- Filtre tutucusu
- Uyarma ve emisyon optik düzenekleri
- Küvet tutucusu
- Emisyon panjuru
- Emisyon monokromatörü
- Dedektör
- Kuartz küvet
- Katı numune tutucusu

Işık kaynağından gelen ışın öncelikle uyarma monokromatörüne gelir. Burada molekülü uyarmak için kullanılacak ışınlar geçerken diğerleri ayrılır. Floresans olayı numuneden tüm yönlere doğru gerçekleşir. Ancak en doğru sonucu veren uyarma ışınına göre dik açıdan gerçekleşen floresanstır. Farklı açıda gerçekleşen floresanslar saçılmaya neden olur ve ölçüm hatası oluşturur. Numuneden yayılan ışın emisyon monokromatöründen geçtikten sonra dedektöre ulaşır. Referans ışın demeti ile numuneden elde edilen ışın cihaz tarafından karşılaştırılarak anlamlı bir çıktı haline getirilir. Floresans olayının şematik gösterimi Şekil 1.32’de verilmiştir.



Şekil 1.32. Floresans spektrometresi çalışma prensibi

Floresans spektrometresinde en sık kullanılan lamba düşük basınçlı civa buhar lambasıdır. Civa buhar lambası 254, 302, 313, 546, 578, 691 ve 773 nm’de ışınlar üretir. Civa buhar lambasında çeşitli dalga boylarında ışınlar üretilebildiğinden farklı maddelerin analizine olanak sağlamaktadır. Floresans spektrometresinde ışın ayırıcı olarak genelde bir veya iki optik ağı monokromatörler kullanılır. Dedektör olarak en yaygın kullanılan cihaz fotoçoğaltıcı tüplerdir. Küvet olarak ise cam veya silisden yapılan silindirik veya dikdörtgen prizmalar kullanılır.

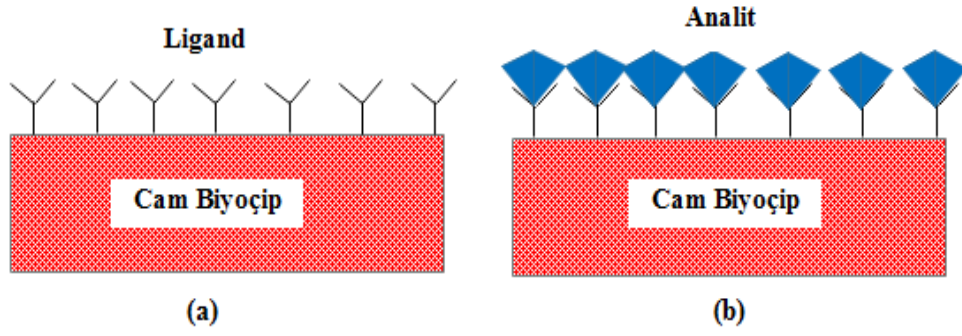
1.6. Reflaktometrik İnterferans Spektroskopisi (RİfS)

Reflaktometrik interferans spektroskopisi beyaz ışığın ince yüzey üzerinden çoklu yansıması temeline dayanan etiketlemeye ihtiyaç duymayan bir tayin metodudur. Bu yöntemde kullanılan biyoçipler cam yüzeye sahiptir. Tipik bir çip örneği Şekil 1.33’de verilmiştir.



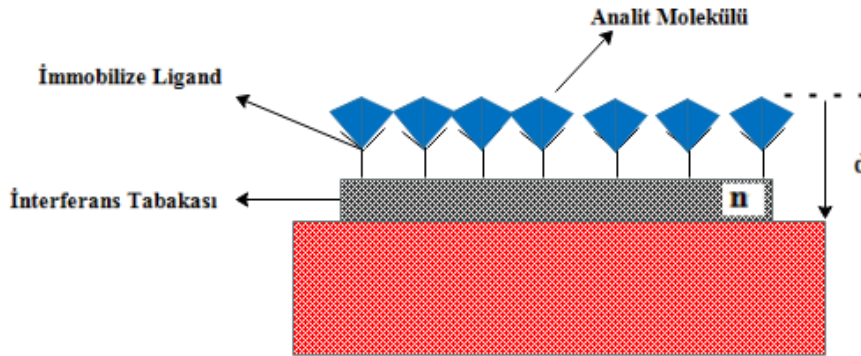
Görsel 1.2. CMD çip

Çip yüzeyinin cam olması fonksiyonel grupların bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Çip yüzeyine immobilize edilen ligand ile analit etkileşime girdiğinde çip yüzeyinin kalınlığı artar ve bunun sonucunda da spektrumda değişim meydana gelir. Çip yüzeyine ligand olarak antijenler, antiadiler, proteinler, peptitler, nükleik asitler, aptamerler immobilize edilebilir.



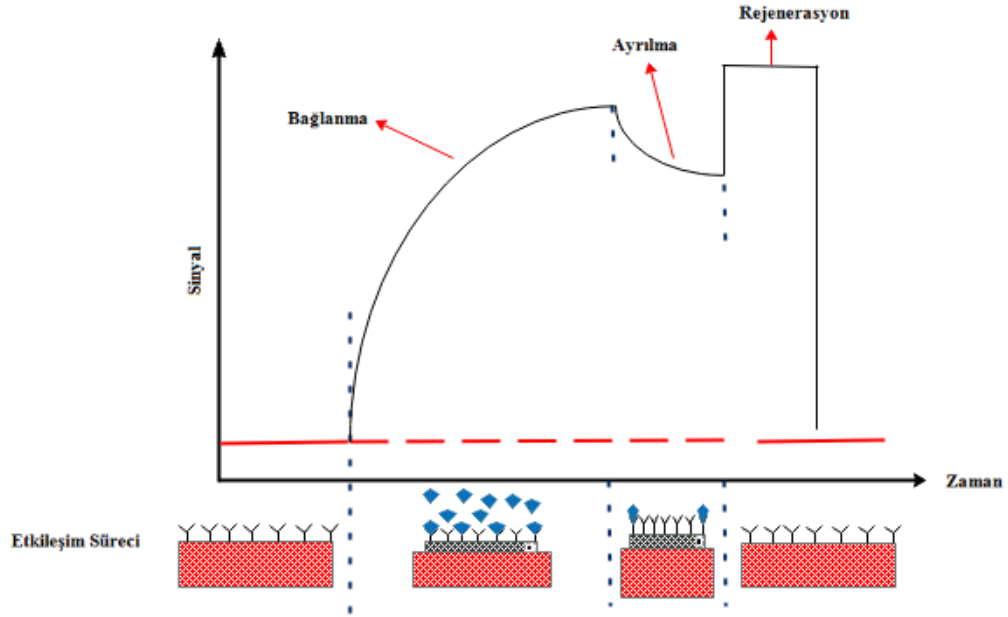
Şekil 1.34. Cam biyoçipin kullanımı, (a) ligand immobilize biyoçip (b) analit ile etkileştirilen biyoçip

Cam yüzeye kimyasal modifikasyon gerçekleştirildikten sonra yüzeye bağlanan analit molekülleri yüzey kalınlığını artırır ve bunun sonucunda da kırılma indisinde değişim meydana gelir. Bu durum Şekil 1.35’de gösterilmiştir. Optik kalınlıkta meydana gelen değişim girişim spektrumunda değişmeye sebep olmaktadır. Bu sayede analit molekülünün bağlanma davranışı izlenir.



Şekil 1.35. Cam biyoçipin analit ile etkileşimi ile kalınlığının artışı

Biyoçip yüzeyine analit molekülleri bağlanmaya başladığında reflaktometrik interferans spektrometresi cihazında sinyal artışı meydana gelmektedir. Sinyalin arttığı bu sürece bağlanma süreci denilmektedir. Numune analizi sona erdikten sonra çip yüzeyine bağlanan analit moleküllerinin uzaklaştırılması basamağına geçilmektedir. Bu sürece ise ayrılma süreci denilmektedir. Çip yüzeyinden bağlanan tüm analit moleküllerinin uzaklaştırılıp analiz öncesi duruma dönülmesine ise rejenerasyon denilmektedir.



Şekil 1.36. Refloktometrik interferans spektroskopisi ölçüm basamakları

1.7. Moleküler Baskılanmış Polimerler

Moleküler etkileşim ilk olarak 19. yüzyılda enzim substrat ilişkisinin açıklanmasıyla ortaya konmuştur. Burda bahsedilen etkileşim enzim ile substrat arasında meydana gelen “anahtar-kilit” modelidir. Bu kavramdan yola çıkarak geliştirilen en önemli uygulama yöntemi moleküler baskılama yöntemidir. Moleküler baskılama ile antibadi-antijen veya enzim-substrat gibi birbirlerine karşı tanıma özelliğine sahip türlerin polimerik yapılara aktarılması amaçlanmıştır. Böylece farklı matrikslerden iyonlar, organik moleküller ve biyomoleküllerin seçiciliği yüksek bir biçimde ayrılması için akıllı polimerler elde edilmesi ve bunun farklı uygulamalarda kullanılmasını yaygınlaştıran yeni bir malzeme geliştirme yöntemi ortaya çıkarılmıştır.

Moleküler baskılama tekniğinde hedef molekülün etrafı bir polimer ile sarılır. Çapraz bağlı monomerler hedef molekülün etrafında polimerleşirler. Monomerler ile hedef molekül arasındaki kimyasal etkileşim sonucunda kompleks meydana gelmektedir. Polimerleşme işleminden sonra hedef molekül ortamdan uzaklaştırılır. Böylece polimerin içerisinde molekül ile aynı boyutsal özelliklere sahip bir kalıp elde edilir. Elde edilen kalıp hedef molekülü seçici olarak tekrar bağlayabilen polimerik bir bellek gibi davranmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerlerin iki önemli özelliği

vardır. Bunlar tanıma yeteneği ve seçici olarak hedef moleküle bağlanma yeteneğidir [41].

Moleküler baskılanmış polimerler ile biyolojik reseptörler kıyaslandığında ortaya çıkan farklılar şu şekilde sıralanabilir;

- Moleküler baskılanmış polimerler katı haldedirler ve çözünmez yapıya sahiptirler.
- Biyolojik reseptörler küçük boyutlara sahip ve çözünürdürler.
- Moleküler baskılanmış polimerler hedef molekülün bağlanması açısından milyonlarca bağlanma bölgesine sahiptirler.
- Biyolojik reseptörler genelde bir tek bağlanma bölgesine sahiptir.
- Moleküler baskılanmış polimerlerin bağlanma bölgelerinin dağılımı heterojendir.

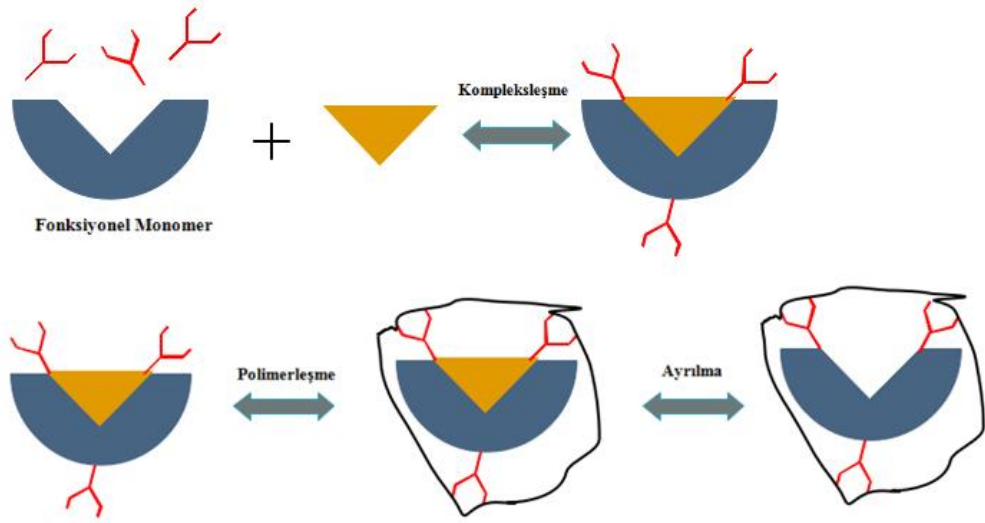
Moleküler baskılanmış polimerler doğal reseptörlerin yerini tam olarak alamamaktadırlar. Çünkü polimerlerin karmaşık yapısı nedeniyle gözenek büyüklüğü ve bağlama bölgelerinin heterojen dağılması hedef moleküle olan seçiciliği ve duyarlılığı olumsuz etkilemektedir.

Moleküler baskılanmış polimerler ısıya, basınca yüksek asidik ve bazik ortamlara karşı yüksek kararlılık göstermektedirler. Bundan dolayı dayanıklılıkları oldukça yüksektir. Ayrıca uzun zaman boyunca saklanabilmeleri mümkündür. Bu süre zarfında kararlılıklarını muhafaza edebilmektedirler.

1.7.1. Moleküler baskılama tekniği

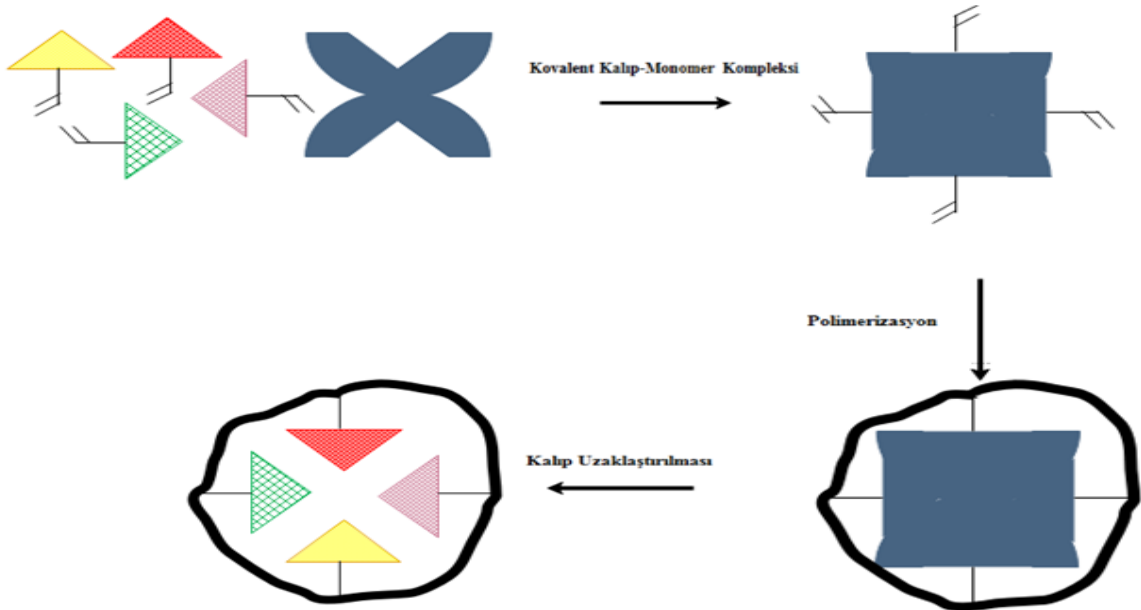
Moleküler baskılama yöntemi 3 aşamadan meydana gelmektedir. Bunlar; ön kompleksleşme, polimerizasyon ve hedef molekülün uzaklaştırılmasıdır. Ön kompleksleşme basamağında fonksiyonel monomer ile hedef molekül arasında bağlanma gerçekleştirilir. Bu işlem için hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri belirleyici rol oynamaktadır.

Polimerizasyon basamağında monomer kalıp kompleksi uygun bir çapraz bağlayıcı yardımıyla polimerleştirilir. Son basamakta ise hedef molekül kalıp oluşturulması maksadıyla polimerden uzaklaştırılır. Bu işlem için uygun bir yıkama prosedürü uygulanır. Moleküler baskılı polimer eldesinde uygulanan işlemlerin şematik gösterimi Şekil 1.37’de verilmiştir.



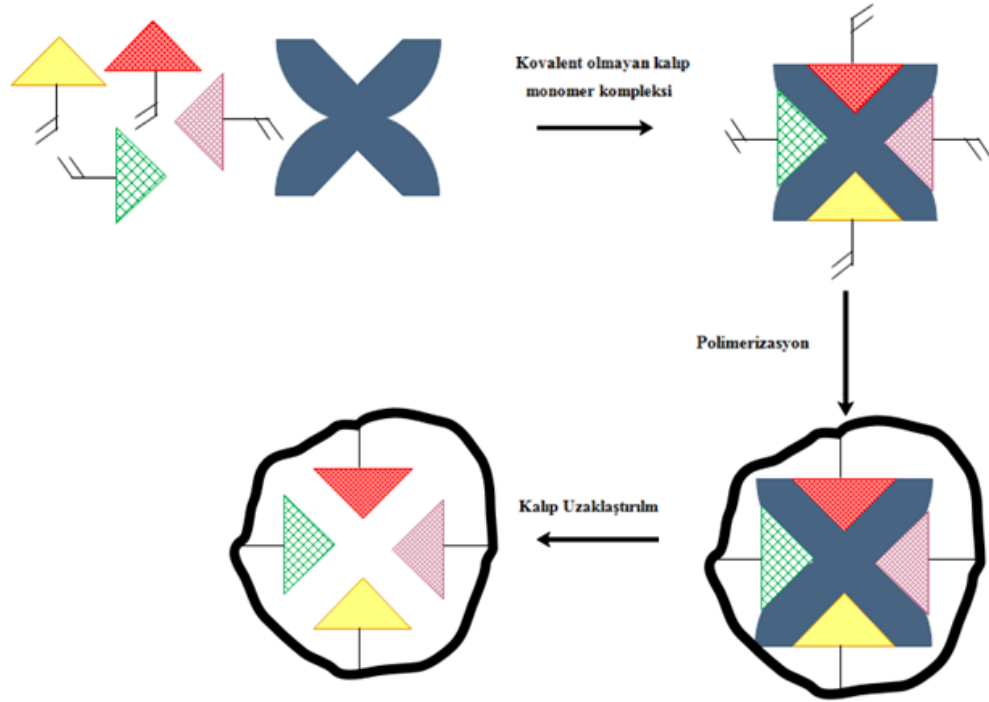
Şekil 1.37. Moleküler baskılı polimer hazırlama aşamaları

Moleküler baskılanmış polimer hazırlamak için iki farklı yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler arasındaki fark kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim farkından kaynaklanmaktadır. İlk yöntem 1977 yılında Wulff ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur. Geliştirilen bu teknikte kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında kovalent bağlanma gerçekleşmektedir. Polimerizasyon boyunca, oluşan bu kompleks yapı kararlılığını korumaktadır. Kovalent bağlanmanın gerçekleştiği yöntemin şematik gösterimi Şekil 1.38’de verilmiştir.



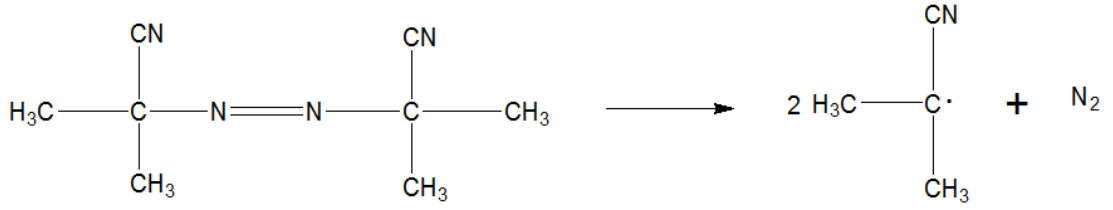
Şekil 1.38. Kovalent baskılama yöntemi

Bir diğ er yöntem 1981 yılında Mosbach ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Burada ise kovalent bağlanma uygulanmamış, onun yerine kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve Coluomb etkileşimleri gibi kovalent olmayan etkileşimlerden yararlanılmıştır. Kovalent olmayan etkileşimle baskılama tekniğı Şekil 1.39’da gösterilmiştir.



Şekil 1.39. Kovalent olmayan baskılama yöntemi

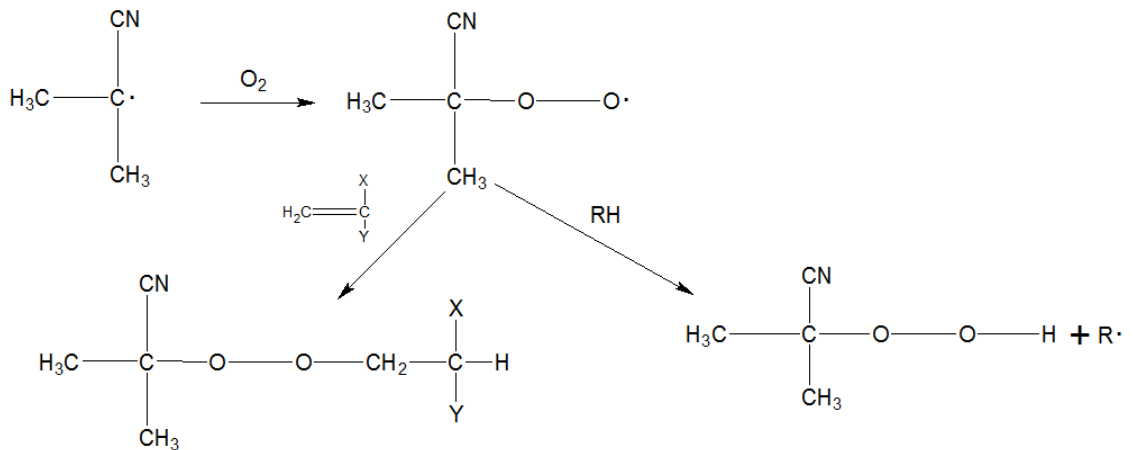
Moleküler baskılama yönteminde en çok kullanılan polimerizasyon tekniğı serbest radikal polimerizasyonudur.       radikal polimerizasyonu farklı uygulamalarda kullanılabilen, hazırlanış ı kolay ve ekonomik bir yöntemdir. Endüstriyel alanda g  n m zde kullanım alanı en yaygın olan tekniktir. Radikal polimerizasyonu kullanılan başlatıcının termal olarak bozulmasıyla başlamaktadır [41, 46]. AIBN’nin bozunma tepkime Şekil 1.40’da g  sterildiğı gibidir.



Şekil 1.40. 2,2'-azobis(izobutironitril) (AIBN)'nin termal bozunma reaksiyonu

Radikal polimerizasyonu yönteminde termal yöntemle radikal elde edilebileceği gibi foto başlatıcılarda kullanılabilmektedir. Foto başlatıcılar özellikle hedef molekül ile fonksiyonel monomerler arasında kovalent olmayan bağların kararsız olmaları durumunda tercih edilmektedirler. Foto başlatıcılar kullanıldığında polimerizasyonun başarısı UV ışınının şiddetine, ışık kaynağı ile olan mesafeye ve oluşturulan radikalın ürüne olan mesafesine bağlıdır.

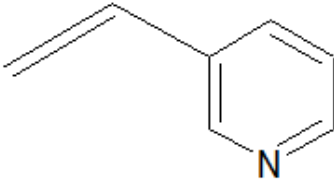
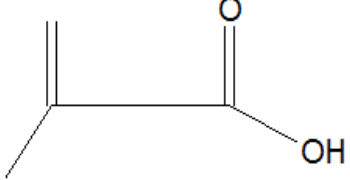
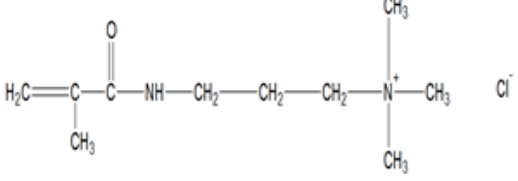
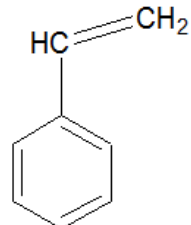
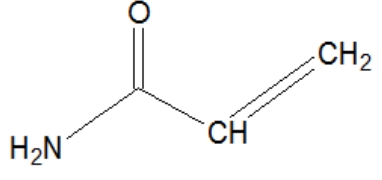
Serbest radikal polimerleşmesinde reaksiyon ortamından oksijenin uzaklaştırılması gerekmektedir. Oksijenin ortamda bulunması durumunda serbest radikale bağlanma riski bulunmaktadır. Şayet oksijen, oluşturulan radikal molekülüyle etkileşirse peroksi radikaller meydana gelmektedir. Bu radikallerde ortamda bulunan polimer, monomer veya diğer türlerle tepkime verebilmektedirler. Bu sebeple polimerizasyon işlemine başlanmadan önce oksijen ortamdan azot veya argon gazı vasıtasıyla uzaklaştırılmalıdır. Oksijen ile başlatıcı radikal arasındaki reaksiyon Şekil 1.41'de verildiği gibidir.



Şekil 1.41. Oksijen ile başlatıcı radikal arasındaki reaksiyon

Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanırken kullanılan monomerler bazik, asidik, yüklü gruplar, hidrofobik ve hidrojen bağı gösterenler olarak sınıflandırılabilir. Bu monomerlerin sınıflandırılması Tablo 1.4’de verilmiştir.

Tablo 1.4. Moleküler baskılı polimer sentezinde kullanılan bazı monomerler

Kullanılan Monomer		Molekül Yapısı
Bazik	Vinilpiridin	
Asidik	Metakrilik asit	
Yüklü Gruplar	3-akrilamidopropiltrimetilamonyum klorür	
Hidrofobik	Stiren	
Hidrojen bağı içerenler	Akrilamid	

Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanırken sadece radikal polimerizasyonu kullanılmamaktadır. Moleküler baskılanmış polimer hazırlanırken kullanılan yöntemler şu şekilde sıralanabilir:

- Yığın polimerizasyonu

- Süspansiyon polimerizasyonu
- Kimyasal grafting
- Yumuşak litografi
- Moleküllerin kendilerini yönlendirmesi yaklaşımı
- Elektropolimerizasyon

Günümüzde en çok kullanılan baskılama yöntemi kovalent olmayan moleküler baskılanmış polimer yöntemidir. Çünkü bu teknikte polimerizasyon öncesinde fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında kovalent olmayan etkileşimler meydana gelmektedir. Bu sayede monomerler molekül etrafında sorunsuz şekilde yerleşebilmektedir. İlave olarak hedef molekül ile monomer arasında kovalent etkileşim için düzenlemeye ihtiyaç duyulmamaktadır [41, 47, 48].

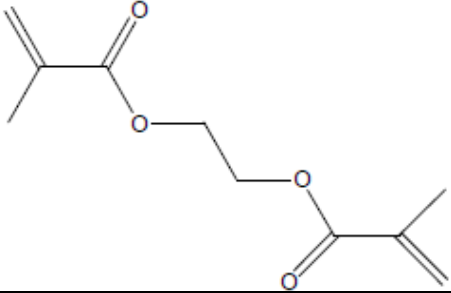
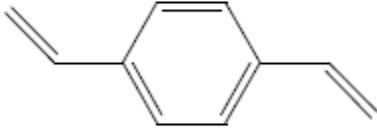
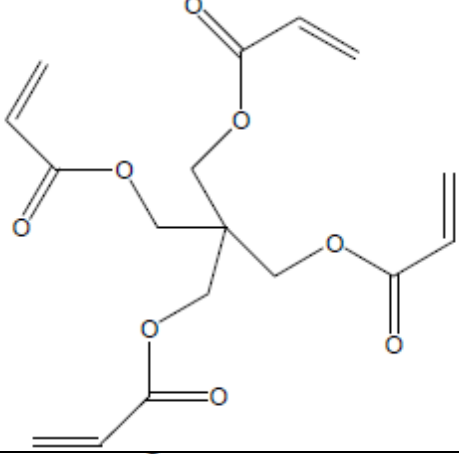
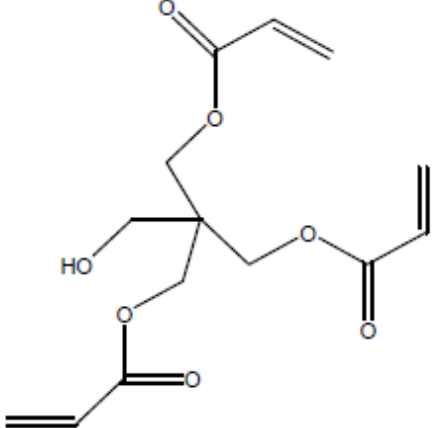
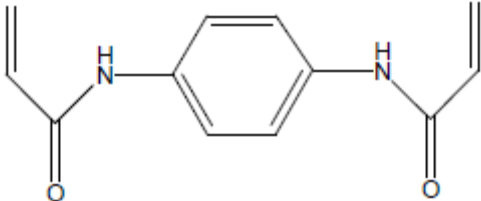
Kovalent olmayan baskılama tekniğinde hedef molekül ile monomerler arasındaki etkileşimler sepesifik değildir. Bağlanma bölgeleri rastgele dağıldığından dolayı hedef molekül dışındaki moleküller içinde bağlanma imkanı olmakta ve bunun sonucu olarak moleküler tanımda azalma meydana gelmektedir [41, 49, 50].

Kovalent etkileşimle yapılan baskılamadan önce hedef molekül ile fonksiyonel monomer arasında oluşturulan kompleksin bağlanma bölgeleri düzenli bir dağılıma sahiptir. Buda analizlerde hedef moleküle olan seçiciliği artırıcı bir özelliktir. Buna rağmen avantaj dezavantaj kıyaslaması yapıldığında kovalent yaklaşım tercih edilmemektedir. Çünkü kalıp molekül ile polimer arasındaki bağlar çok kuvvetli olduğundan molekülün ortamdan uzaklaştırıp kalıp elde etmek kolay değildir [41, 51].

1.7.2. Moleküler baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcılar

Moleküler baskılama tekniğinde kullanılan çapraz bağlayıcılar hedef molekülün polimer yapıdan uzaklaştırılmasından sonra elde edilen kalıbın kararlı olması ve analite özgü ağ örgüsü yapması için kullanılmaktadır. Çapraz bağlayıcılar arasında en çok kullanılan etilen glikol dimetakrilat (EDMA)'dır. Günümüzde sık tercih edilen çapraz bağlayıcıların listesi Tablo 1.5' de verilmiştir [41, 52, 53].

Tablo 1.5. Molekül baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcılar

Çapraz Bağlayıcı	Molekül Yapısı
Etilen glikol dimetakrilat (EDMA)	
p-Divinilbenzen	
Pentaeritrol tetraakrilat	
Pentaeritrol triakrilat	
N,N'-1,4-fenilendiakrilamid	

Tablo 1.5. (Devam) Molekül baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcılar

N,O-bisakriloil-L-fenilalaninol	
N,N'-metilendiakrilamid	
Trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM)	

1.7.3. Moleküler baskılamada kullanılan çözücüler

Moleküler baskılama işlemi bazık ortamlarda uygulanır. Kullanılan çözücü, polimerizasyon esnasında kullanılan maddelerin çözülmesini, tüm türlerin tek fazda bulunmasını ve sıcaklığın dağılımını sağlar. Çözücünün seçimi uygulanacak olan baskılama yöntemine bağlıdır. Şayet kovalent baskılama uygulanacaksa çözücüde aranan özellik reaksiyon ortamındaki türlerin çözülmesinin sağlanmasıdır. Bu nedenle bir çok çözücü kullanılabilir [41, 54]. Kovalent olmayan baskılamada ise bir etkileşimin meydana gelmesi amaçlandığından çözücünün seçimi daha önemlidir. Polemerizasyon da kullanılacak olan çözücü H-bağları ve elektrostatik etkileşimlerin sağlanması maksadıyla az polar veya aprotik olmalıdır. Polar olmayan çözücülerin kullanıldığı

baskılama tekniği ile elde edilen polimerlerin analite seçiciliği daha yüksek olmaktadır [41,55].

1.7.4. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulama alanları

Molekül baskılanmış polimerler tanıma tabakası olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Farmakolojik, analitik ve biyolojik çalışmalarda analiz edilecek moleküle özgü seçici yapılar bu yöntemle elde edilmektedir [48]. Kromatografide, elektroforezde, elektrokromatografide ve katı faz ekstraksiyonda zaman ilerledikçe kullanımı artmaktadır [56,57].

Moleküler baskılama ile elde edilen polimerlerin bir diğer kullanım alanı ise sensör teknolojidir. Bu şekil de elde edilen polimerler amino asitlerin, ilaçların, şeker türevlerinin ayırımı için, iyon seçici tabaka olarak kullanılmaktadır [50,58].

MIP bazlı faz ayrımlarında enantiyometrik kalıp molekül kullanılarak kovalent veya kovalent olmayan etkileşimle yüksek seçiciliğe sahip polimerler hazırlanır. Elde edilen polimer ezilerek toz haline getirilir ve hazırlanan kolona doldurulur. Bu kolon yardımıyla ayırma işlemleri gerçekleştirilir [49].

1.8. Elektro-Çekme Yöntemi

Nanolif; nano boyutta olup ipliksi görünümüne sahip olan ve nanoteknoloji çalışmalarında kullanılan yapılardan biridir. Çapları 1,0 mikrondan daha küçük olan liflerdir. Nanolifler tanımlanırken lif çapları göz önüne alınmaktadır. Genel olarak nanoliflerin çapları 50 ile 300 nanometre arasındadır. Lifin çapı küçüldükçe birim kütleye düşen yüzey alanı büyük olmaktadır. Geniş yüzey alanına sahip olunması fonksiyonel grupların, iyonların ve çok çeşitli partiküllerin immobilizasyonunu kolaylaştırır.

Nanolifler genel itibarıyla 5 yöntemle elde edilmektedir. Bu yöntemler ;çekme, kalıp ile sentezleme, faz ayrışması, kendi kendine toplanma ve elektro-çekme olarak sıralanabilir. Elektro-çekme yöntemi dışındaki yöntemlerde mekanik kuvvetler esas alınmaktadır. Elektro-çekme yönteminde ise elektrik alan kullanılarak, sentezlenen polimerden lif oluşumu sağlanmaktadır [59].

Nanolif üretiminde uygulanış kolaylığı ve elde edilen liflerin çaplarının küçük olmasından dolayı en etkin yöntem elektro-çekmedir. Elektro-çekme ile nanolif üretiminde öncelikle kullanılacak polimer uygun bir çözücüde çözülür veya ısı yardımıyla eritilir. Daha sonra bir pipet veya enjektörün içine konulur [60].

Polimer çözeltisi-eriyiği bulunan pipetin açık ucunun bulunduğu noktaya gerilim uygulanır. Pipetin karşısına topraklanmış iletken bir levha yerleştirilir. Pipetin ucuna uygulanan gerilim ile birlikte polimer çözeltisi-eriyiği topraklanmış levha yüzeyine lifler oluşturarak toplanır.

Elektro-çekme yönteminde uygulanan temel mantık; polimer çözeltisine uygun bir gerilim uygulandığında pipetin ucundan polimer çözeltisinin-eriyiğinin gerilim farkı nedeniyle levha üzerine toplanması üzerine kurulmuştur.

Nanolifler yapısal bakımdan incelendiğinde yapılarında bulunan büyük molekül zincirlerinden dolayı, klasik fizik, yüzeylerindeki atomlardan dolayı, kuantum fiziği ile açıklanabilecek özelliklere sahiptir. Nano boyutta elde edilmeleri sayesinde yüzey enerjileri, mukavemetleri ve iletkenlikleri bulunmaktadır [61]. Lif çapları 100 nm' nin altına indikçe nanoliflerin elastik modülü ve mekanik güçleri artmaktadır [62].

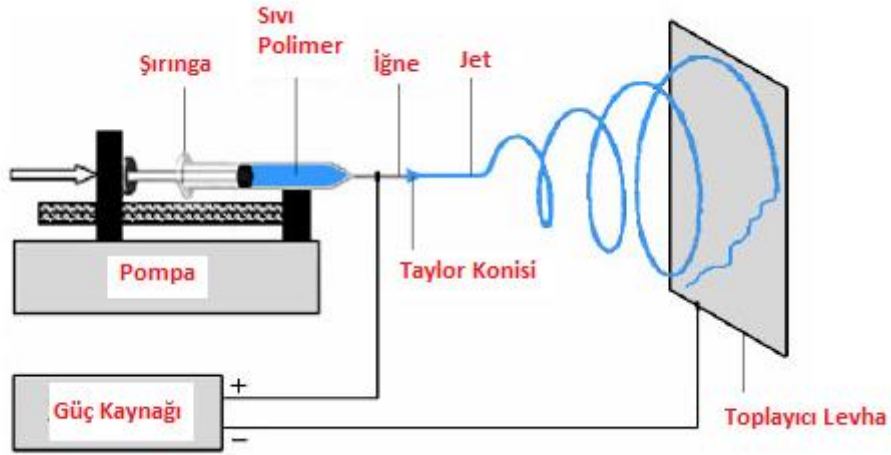
Elektro-çekme yöntemi sayesinde, birim hacim başına yüksek yüzey alanına sahip, lif çapı çok küçük olan nanolifler elde edilebilmektedir. Nanolif elde edilirken iletken polimerler, metaller, yarı iletkenler kullanılarak nano seviyede elektrik iletkenliğine sahip lifler elde edilebilmektedir [63].

1.8.1. Elektro-çekme sisteminin çalışma prensibi

Elektro-çekme sisteminin kurulumu genel itibarıyla basittir. Bir elektro-çekme düzeneği kurmak için temel olarak 4 elemana ihtiyaç vardır. Bunlar; güç kaynağı, numune ünitesi (şırınga, piper vs.), topraklanmış iletken levha, sıvı halde viskoz polimerdir.

Şırınga içerisine konulan sıvı haldeki polimer toplayıcı levhaya belirli bir mesafeye yerleştirilir. Güç kaynağından gelen pozitif kutup şırınganın metal iğnesine bağlanır. Negatif kutup ise toplayıcı levhaya yerleştirilir. Daha sonra toplayıcı levha topraklanır. Bu işlem sayesinde şırınga ve toplayıcı levha arasında elektrik alan elde edilmiş olur.

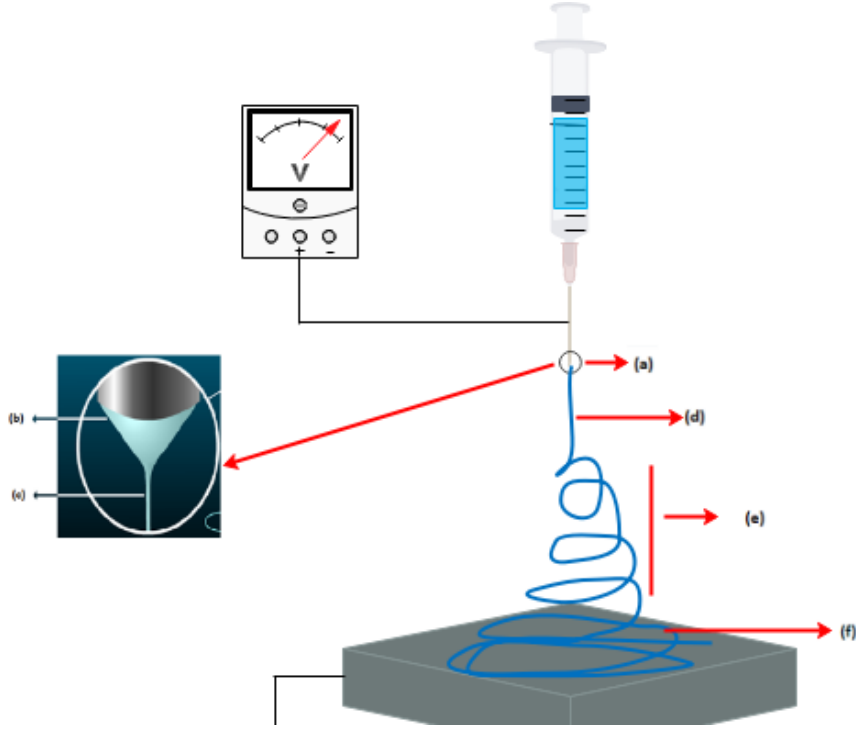
Düzenek bu şekilde kurulduktan sonra güç kaynağının gerilimi yavaş yavaş artırılır. Gerilim yeterli değerine ulaştığı zaman çözelti üzerindeki viskoelastik ve yüzey gerilimleri aşılmış olur. Sonuç olarak polimer molekülleri jet halinde toplayıcı levhada birikmeye başlarlar. Elektro-çekme işleminin nasıl gerçekleştiği Şekil 1.42'de şematik olarak anlatılmıştır.



Şekil 1.42. Elektro-çekme çalışma düzeni

Şırınganın ucuna uygun voltaj verildikten sonra oluşan polimer jetler, toplayıcı levhaya düz ilerledikten bir müddet sonra spiral bir yol izlemeye başlarlar. Elektriksel kuvvetler jeti uzatır. Böylece çok ince lifler elde edilir. Jet haline gelen polimer molekülleri toplayıcı levhaya doğru ilerlerken, çözücü buharlaşır ve levha üzerinde katı lifler elde edilir. Gözle görülemeyecek şekilde hızlı gerçekleşen bu süreç sayesinde nanometre mertebesinde çapa sahip lifler üretilmektedir [64].

Elektro-çekme ile nanolif elde edilirken, şırıngaya gerilim uygulandıktan sonra şırınga iğnesinin ucunda Taylor konisi oluşur. Küçük hacimdeki elektriksel olarak iletken sıvı, elektrik alanına maruz bırakıldığında yüzey gerilimi kaybolmaya başladıkça sıvının şekli bozulmaya başlamaktadır. Uygulanan potansiyel arttıkça sıvı damlaya etki eden elektrik alan, yüzey gerilimini yenmeye başlar. Yüzey geriliminin elektrik alan karşısında etkisini kaybetmeye devam etmesi sonucunda, sıvı damlacık dış bükey yan bölgeler ile yuvarlak bir uca sahip olan koni şeklini almaya başlar. Uygulanan gerilim eşik değerinin üstüne çıktığında koni kısmından jet oluşmaya başlar. Bu olaya koni-jet ismi verilir [65]. Şekil 1.43’de nanolif oluşumunun şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 1.43. Nanolif oluşumunun şematik gösterimi, (a) damlacık oluşumu, (b) taylor konisi oluşumu, (c) elektro çekme jetinin oluşumu, (d) kararlı bölgede jetin uzaması, (e) kararsız bölgenin oluşması, (f) lif formunda katılma

Taylor konisinden çıkan jetler belirli bir süre boyunca kararlı şekilde hareket ederler. Belirli bir mesafeden sonra jetlerdeki bu kararlı yapı bozulmaya başlar. Kullanılan polimerin çözeltisi veya eriyiğinin özelliğine ve sistem değişkenlerine bağlı olarak değişebilen üç kararsızlık hali mevcuttur. Jet bu kararsızlık hallerinden sadece birini gösterebileceği gibi üç kararsızlık halini de gösterebilir. Bu kararsızlık halleri; klasik rayleigh kararsızlığı, eksenel simetrik elektrik alan akımlanması ve whipping kararsızlığı olarak açıklanmış ve matematiksel olarak modellenmiştir [66].

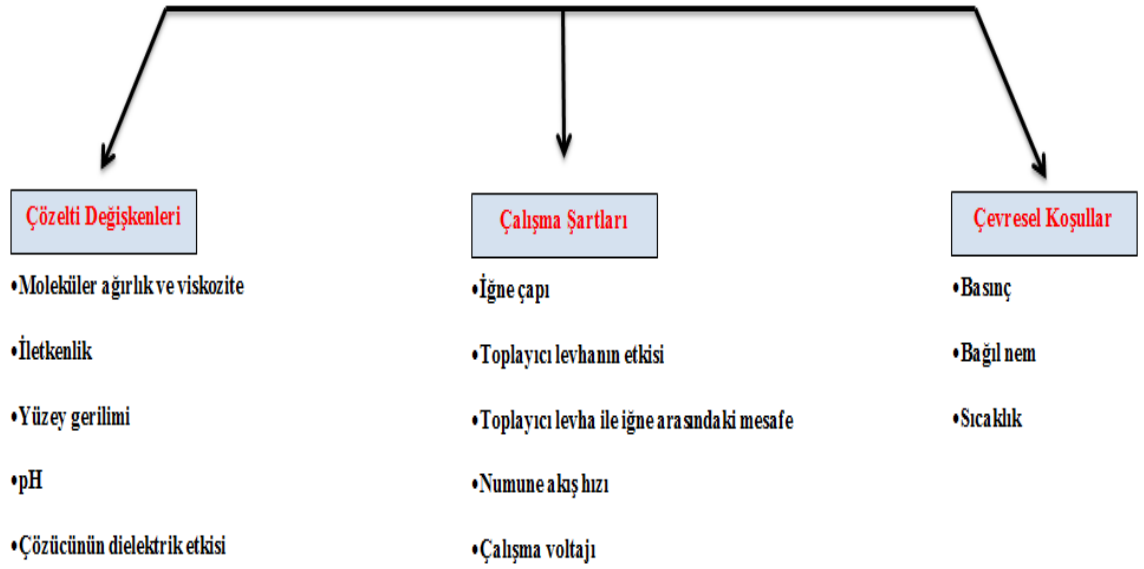
Elektro-çekme işlemi sırasında dikkat edilmesi gereken hususlar şu şekilde sıralanabilir;

- Uygun çözücü seçilmesi
- İğnenin ucundan toplayıcı levhaya kadar olan mesafe içerisinde polimer çözeltisinde bulunan çözünün buharlaşması gerekmektedir. Bu sebeple çözücü seçilecekken buhar basıncına bakılmalıdır.
- Çözücünün buhar basıncı dışında akıcılığı ve yüzey gerilimide önemlidir. Akıcılığı düşük olan çözücüler iğnenin ucunu tıkayabilirler.
- Çözelti üzerine uygulanacak gerilim doğru seçilmelidir.

- İğne ve toplayıcı levha arasındaki mesafe çözücünün buharlaşacak olması dikkate alınarak ayarlanmalıdır.

1.8.2. Elektro-çekme işlemine etki eden değişkenler

Elektro-çekme yönteminde elde edilen liflerin özelliklerini belirleyen üç ana unsur şu şekilde sıralanabilir; çözelti değişkenleri, çalışma şartları, çevresel koşullar. Bu parametreler uygun koşullarda ayarlanarak istenilen çapta ve özellikte lifler elde edilebilir. Elektro-çekmeyi etkileyen bu üç ana unsur da kendi içinde sınıflandırılmaktadır. Yapılan sınıflandırma Şekil 1.44’de verildiği gibidir.



Şekil 1.44. Elektro-çekme işlemine etki eden değişkenler

1.8.2.1. Çözelti değişkenleri

Çalışmada kullanılacak olan polimerin molekül ağırlığı viskoziteyi etkilemektedir. Molekül ağırlığı arttıkça, polimer zincir uzunluğu artacak ve böylece de çözeltinin viskozitesine artışa neden olacaktır. Elektro-çekme yöntemiyle lif oluşturabilmek için çözelti viskozitesinin belirli bir değeri aşması gerekmektedir. Şayet istenen viskozite değeri elde edilemezse jet oluşturularak lif elde edilemez. Bunun yerine sıvı damlası jet oluşturamadan şırınganın ucundan düşer [67].

Viskozitesi düşük olan çözeltiler ile lif yapısı elde etmek güç olduğu gibi, viskozitesi çok yüksek olan çözeltiler ile yapılan çalışmalarda da çözelti iğnenin ucunda kuruyacağından dolayı aynı şekilde lif elde edilemez [68].

Çalışma ortamında çoklu jet oluşmadığı durumlarda, elde edilecek olan fiberin çapı daha çok çözeltinin viskozitesine bağlıdır. Çözeltinin viskozitesini arttırmak için polimer çözeltisinin derişimi arttırılır. Viskozite yükseldiği zaman çözeltiler bükülmeye karşı olan kararsızlıklardan daha az etkilenirler. Bu sayede toplayıcı levha üzerinde elde edilen fiberler daha küçük bir alanda toplanırlar. Küçük bir alanda toplanan fiberlerin daha fazla incelememesinden dolayı, elde edilen fiberlerin çapları daha büyük olur [69].

Elektro-çekme işleminde jet oluşumunu sağlayan, damla yüzeyinde toplanan yüklerin itme kuvveti ile polimer çözeltisinin gerilmesidir. Çözeltinin iletkenliği arttıkça damla yüzeyleri daha fazla yüklenecek, bu şekilde jet oluşumu kolaylaşacaktır. Eğer çözelti tamamen gerilmezse lif oluşturulamaz. Bunun yerine boncuk formu oluşur. Çözeltinin iletkenliğini arttırmak için çok küçük miktarda tuz ya da polielektrolit eklenirse iletkenlik artacağından dolayı lif oluşumu gerçekleştirilebilir [68].

Yüzey geriliminin artması sonucu yüzey alanında azalma meydana gelmektedir. Yüzey alanının azalması sonucu damlacık oluşumu meydana gelir. Bundan dolayı yüksek yüzey geriliminin olduğu çözeltilerden elde edilen lifler boncuklu yapıdadır [70]. Yüzey geriliminin düşürülmesi için polimer çözeltisine düşük yüzey gerilimine sahip çözücüler eklenir.

Elektro-çekme işleminde pH değeri elde edilen fiberin geometrik yapısını ve çapını etkilemektedir. Artan pH değeri ile birlikte elde edilen liflerde düzleşme ve incelme tespit edilmiştir. Asidik ortamda yani düşük pH'larda ise elde edilen liflerde boncuklu yapılar gözlemlenmiştir [71].

Elektro-çekme işleminde jete etki eden bükülme kararsızlıkları, çözeltinin artan dielektrik sabiti ile artmaktadır [72].

1.8.2.2. Çalışma şartları

Elektro-çekme yönteminde uygulanan potansiyel sayesinde gerekli olan elektrik alan elde edilir. Oluşturulan elektrik alan sayesinde çözeltinin eğrilmesi sağlanır. Genel olarak 6 kV 'tan büyük negatif veya pozitif voltaj, iğne ucunda Taylor konisi oluşturmak için kullanılır [73].

Oluşan Taylor konisinden jet elde edilebilmesi için kritik bir voltaj değeri bulunmaktadır. Farklı voltaj değerleri uygulanarak jet oluşumuna olanak sağlayan voltaj değeri belirlenir. Taylor konisini stabil olarak elde edebilmek için besleme hızı ve uygulanan gerilim iyi ayarlanmalıdır. Uygulanan voltaj değerinin yüksek olması liflerin fiziksel özelliğini değiştirdiği gibi, kristal yapısını da değiştirir. Elektrik alan elektro-

çekme esnasında polimer moleküllerin düzenli olarak yığılmasına sebep olduğu için kristalinite artar [69].

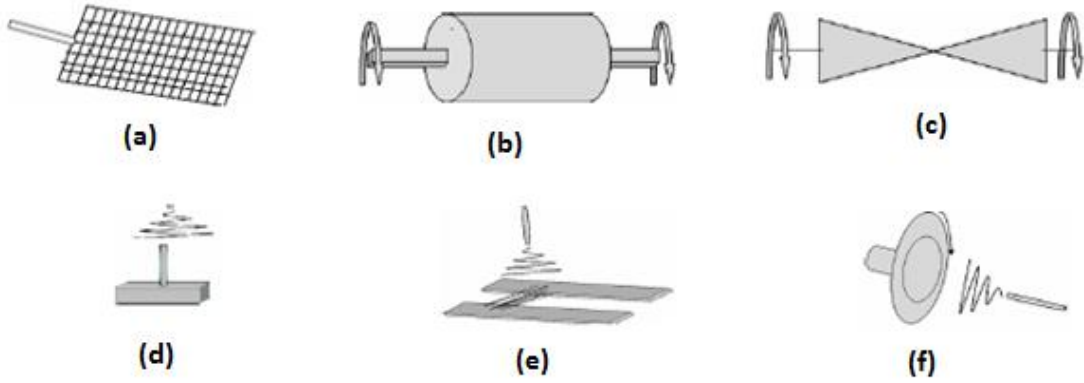
Nanolif elde edebilmek için iğnenin ucunda Taylor konisi oluşturulmalıdır. Taylor konisi elde edilebilmesi için numune akış hızı çok iyi ayarlanmalıdır. Numunenin akış hızı arttırıldığında iğnenin ucunda toplanan miktar artacağından dolayı damlacığın boyutu da artar. Bu durumda elde edilen liflerin çapları büyük olur. Ayrıca akış hızının artışıyla birlikte çözücü miktarı da artacağından dolayı çözücünün buharlaşması daha fazla zaman alır. Eğer daha küçük çaplı ve daha kısa sürede nanolif elde edilmek isteniyorsa akış hızı düşük tutulmalıdır [68].

Toplayıcı levha ile lif arasında; lif oluşumu ve çözücünün buharlaşması olayları gerçekleşir. Aradaki mesafenin arttırılması ile oluşan jetin levhaya ulaşma süreside artar. Jetin toplayıcı levhaya daha uzun sürede ulaşması sonucunda elde edilecek lifin inceliği artar. Ayrıca çözücünün buharlaşabilmesi için daha fazla süre olacağından lifler kuru bir şekilde toplanırlar [69].

Toplayıcı levha ile iğne arasındaki mesafe düşük tutulursa çözücünün buharlaşması için geçecek süre kısıtlı olduğundan dolayı lifler ıslak olarak toplanırlar. Bu da boncuklu yapıların oluşmasına neden olur [67].

Elektro-çekme işlemi sonucu nanolif elde edebilmenin ilk kuralı numunenin konulduğu şırınga ile toplanacağı levha arasında elektrik alan oluşturulmasıdır. Elektrik alanın sağlanabilmesi için toplayıcı olarak kullanılan malzemenin iletken olması gerekmektedir. Ayrıca potansiyel farkı arttırmak için kullanılacak olan iletken levha topraklanır.

Elektro-çekme sonucunda elde edilecek liflerin iletken olmayan bir yüzey üzerinde toplanması isteniyorsa, iletken bir levhanın önüne fiberlerin toplanılması istenen yalıtkan yüzey eklenir. Toplayıcı levha üzerine toplanan lifler yüklerini kaybederler. Yalıtkan olan toplayıcı topraklanmadığından dolayı lifler üst üste birikemez ve yüzeyde daha seyrek birikirler [61]. Elektro-çekme işleminde kullanılan bazı toplayıcılar Şekil 1.45’de verilmiştir.



Şekil 1.45. Elektro-çekme işleminde kullanılan bazı toplayıcılar, (a) ızgara, (b) dönen silindir, (c) dönen koniler, (d) ince iletken çubuk, (e) paralel metal çubuk, (f) rotor

Kaynak: Dalton,2005, s.211

Kullanılacak olan iğnenin çapı azaltıldığında, oluşacak olan damla da küçüleceğinden dolayı yüzey gerilimi artacaktır. Artan yüzey gerilimi ile birlikte oluşan jetlerin hızı azalır. Yavaşlayan jetin toplayıcı jete ulaşacağı süre artacağından çözücünün buharlaşarak uzaklaşması daha kolay olur. Böylece daha ince ve boncuksuz lifler elde edilebilir [61].

1.8.2.3. Çevresel koşullar

Sıcaklık çözücünün buharlaşma oranını arttırırken çözelti viskozitesini düşürür. Daha düzenli küçük çaplı fiberler elde edilir ancak çözeltiye enzimler ve proteinler eklendiğinde yüksek sıcaklıkta bozunabilirler [61].

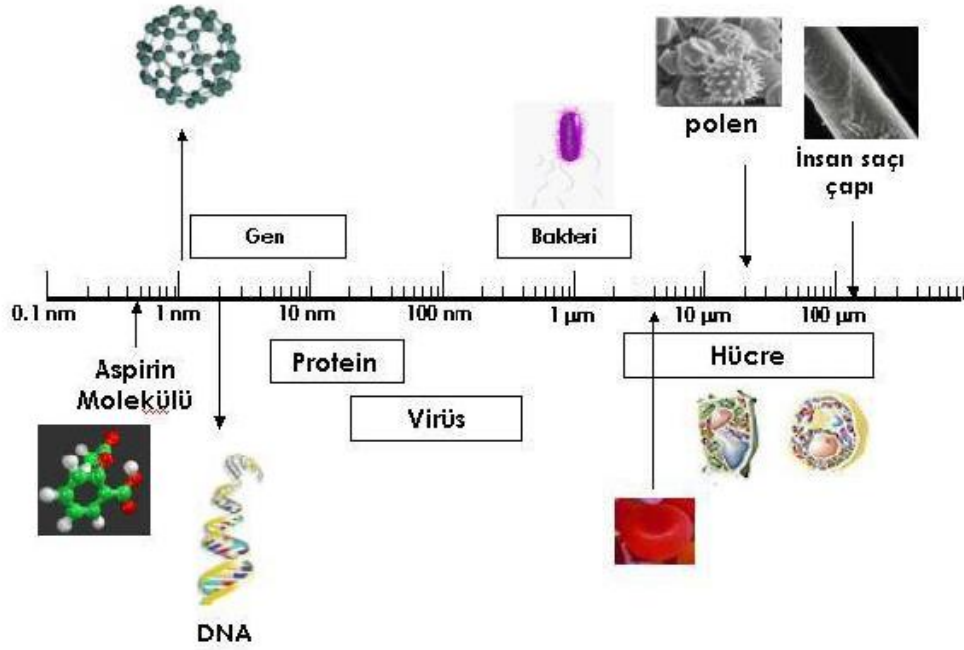
Ortamdaki nem arttıkça çözelti yüzeyinde oluşan elektrostatik yüklenme azalacağından dolayı elde edilen liflerin çapı artar. Ayrıca ortamdaki nem miktarı çözücünün buharlaşma süresini de etkilemektedir. Nem oranı arttıkça uçucu olan çözücü daha uzun sürede buharlaşır [72].

Elektro-çekme işlemi uygulanırken ortamın basıncı şayet atmosfer basıncından daha düşük ise polimer sıvısının akmaya karşı direnci azalacaktır. Bu nedenle jet oluşumunda kararsızlıklar ortaya çıkar. Viskozitesi düşük olan çözeltilerde düşük basınç altında elektro-çekim yapmak mümkün olmayabilir. Viskozitesi büyük olan çözeltilerde ise vakum altında elektro-çekme gerçekleştirilebilir [72].

1.9. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji kavramında geçen “Nano” ön eki Latince’den gelmektedir ve “cüce, çok küçük” anlamında kullanılmaktadır. Kimya alanında nano kelimesi uzunluk kavramında nanometre olarak kullanılmaktadır. Nanometre metrenin milyarda bir büyüklüğüne karşılık gelmektedir [75].

Nanometre ifadesinin boyutsal olarak daha iyi anlaşılması bakımından değişiklik büyüklüklere sahip varlıklarla kıyaslanması yapılabilir. Örneğin; bir kağıdın kalınlığı yaklaşık 100000 nm, insan saç teli yaklaşık 25000 nm, DNA sarmalı 2 nm civarındadır. Şekil 1.46’da farklı boyutlardaki varlıklara ait boyut skalası verilmiştir.



Şekil 1.46. Boyut skalası

Kaynak: Miller,2004, s.121

Madde küçüldükçe özelliklerinde de değişimler meydana gelmektedir. Boyutlar azaldıkça maddenin kuantum davranışları maddenin fiziksel özelliklerinin belirlenmesinde ön plana çıkmaktadır. Nano boyuttaki maddelerde, atom yapısının, bağlı atomların cinsinin, yapının büyüklüğünün maddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde büyük etkileri olduğu görülmektedir. Bu duruma örnek olarak karbon atomları gösterilebilir. Karbon atomlarından oluşan bir elmas kristali yalıtkan özellik gösterirken, karbon atomu ise yüksek derecede iletkenlik özelliğine sahiptir [77, 78].

Nanoteknoloji; boyutları nanometre seviyesinde olan ve özellikleri açısından değerlendirdiğinde çok büyük avantajlar sağlayan malzemelerin üretimini ve geliştirilmesini tanımlamaktadır [79]. Nanoteknoloji ile amaçlanan üstün özelliklere sahip malzemeler ve sistemler üreterek bunları nano boyutta elde edilebilir kılmaktır [80].

Nanoteknolojideki gelişmeler ile biyoteknolojinin birleştirilmesi ile nanobiyoteknoloji alanı ortaya çıkmıştır. Bu sayede tıp alanında önceden mümkün olmayan tanılarının yapılması sağlanmıştır. Son yıllarda nanoteknoloji, enzim, protein, antijen, antikor gibi biyolojik moleküllere uygulanmaya başlamıştır. Bunun sonucunda farklı analiz yöntemleri geliştirilmiştir [78].

Şuan kullanılmakta olan nanoteknoloji kavramı 1959 yılında Amerikan Fizik Topluluğu'na konuşma yapan Richard Feymann tarafından ortaya konulmuştur. Başlığı “En altta biraz yer var” olan konuşmasında günün birinde kalın ansiklopediklerin toplu iğne ucundan küçük alana sığdırılacağını söylemiştir. İlerleyen yıllarda yaptığı çalışmalarla Nobel ödülü almıştır. 1981 yılında taramalı tünel mikroskopunun (STM) icadı ve 1984 yılında atomik kuvvet mikroskopunun (AFM) icadıyla nano boyutta ölçüm yapılmaya başlanmıştır [78, 81]

Makro boyuttaki bir malzemenin nanoboyuttaki özellikleri incelendiğinde birçok özelliğinde farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Nanoboyutu somut olarak canlandırmak gerekirse on tane yan yana konulmuş hidrojen atomu bir nanometre, DNA molekülleri yaklaşık olarak 2 nm, virüs 150 nm, biyolojik hücrelerin çapı ise bin nanometredir [82]. Nanoteknolojik malzemeler olarak tanımlanan yapılar; nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar veya nano ince filmler gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır.

1.9.1. Nanopartiküller

Boyutsal olarak 100 nm ve daha küçük olan toz halindeki maddelere nanopartiküller denilmektedir. Nanopartiküllerin diğer maddelerden en önemli farkı ve üstünlüğü; kuantum boyut etkileri, elektronik yapıları ile boyutları arasındaki ilişki, yüksek yüzey/hacim oranı olarak sıralanabilir [76, 78, 83].

Günümüzde kullanılan malzemelerin ve teknolojilerin nano boyuta taşınması ile birlikte nanotaşıyıcılar, sensörler, nanomakinalar ve yüksek kapasiteli veri depolama hücreleri gibi özgün özelliklere sahip küçültülmüş cihazların üretilmesinin önü açılmıştır [84].

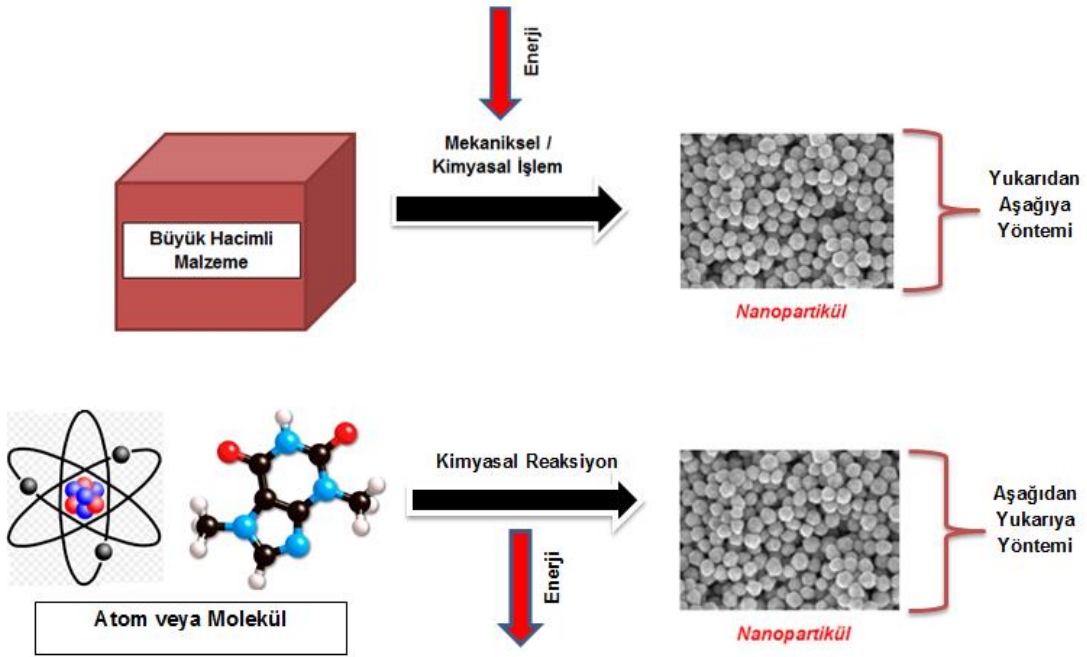
Nanopartiküller özelliklerine göre en basit şekliyle aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir [85];

- Karbon bazlı nanopartiküller (karbon nanotüpler),
- Metal bazlı nanopartiküller (altın kolloidler, nanoçubuklar,)
- Yarı iletken bazlı nanopartiküller (kuantum noktaları vb.).

Nanopartiküller yapıları gereği kararsızdırlar. Kararsızlık nedeniyle çözeltileri hazırlanırken topaklanma oluşumu meydana gelir ve homojen çözeltilerinin hazırlanmasını zorlaştırır. Bunun önüne geçmek için farklı sentez yöntemleri ve farklı yüzey modifikasyonları geliştirilmiştir. Çözelti hazırlanacakken ortama yüzey aktif maddeler ilave edilerek topaklanma önlenmektedir [86].

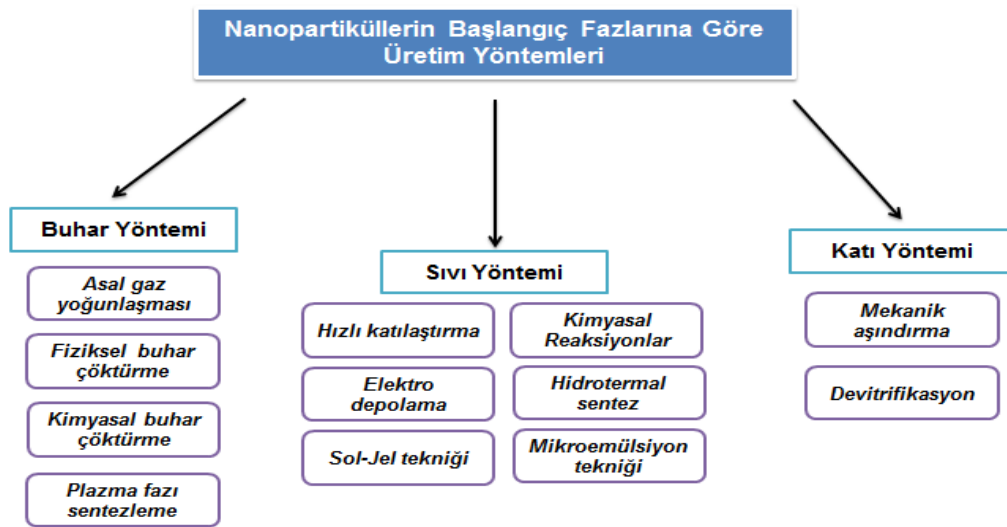
1.9.1.1. Nanopartiküllerin üretim yöntemleri

Nanopartiküller üretilirken iki farklı yaklaşımdan yararlanılır. Bunlar “aşağıdan yukarı” ve “yukarıdan aşağı” olarak isimlendirilir. Yukarıdan aşağı yönteminde nanopartikül elde edilecek malzemeye mekanik ve/veya kimyasal işlemler ile enerji uygulanarak malzemenin nano boyuta sahip küçük parçalara ayrılması sağlanır. Bu işleme örnek olarak mekanik öğütme verilebilir. Aşağıdan yukarı tekniğinde ise; boyutsal olarak çok küçük malzemelerin kimyasal reaksiyonlar yardımıyla büyütülerek nanopartikül oluşumu sağlanmaktadır. Bu yaklaşımın en çok bilinen örnekleri ; kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma ve spreylendirme [87]. Nanopartiküllerin üretim yaklaşımlarının şematik gösterimi Şekil 1.47’de gösterildiği gibidir.



Şekil 1.47. Nanopartikül üretiminde kullanılan yöntemler

Nanopartiküllerin elde edilme yöntemlerini yukarıda olduğu gibi çıkış maddesinin boyutsal yapısından yararlanarak sınıflandırmak mümkün olduğu gibi, başlangıç fazlarından yola çıkarak sınıflandırmakta mümkündür. Buna göre buhar, sıvı ve katı yöntemler olarak da üç farklı teknik ortaya çıkmaktadır. Nanopartiküllerin başlangıç maddelerine göre üretim yöntemlerinin şematik gösterimi Şekil 1.48’de verilmiştir.



Şekil 1.48. Nanopartiküllerin başlangıç fazlarına göre üretim yöntemleri

1.9.1.1.1. Kimyasal buhar yoğunlaştırma yöntemi

Bu yöntem genellikle çok miktarda nanopartikül elde etmek maksadıyla kullanılmaktadır. İlk kullanımı 1994 yılında Almanya’da gerçekleştirilmiştir. Başlangıç malzemesi olarak metalorganikler, karboniller, klorürler ve hidrürler kullanılmaktadır. Yöntemin esası ısı parçalanmaya dayanmaktadır. Isıl parçalanmaya uğrayan gaz fazındaki maddeler nanopartiküle dönüştürülmektedirler. Başlangıç malzemesi olarak kullanılan maddeler gaz fazına geçirildikten sonra gaz akımıyla reaktöre taşınırlar. Reaktör içerisinde bulunan fırınların içerisinde ise ısı parçalanma olayı gerçekleşmektedir. Başlangıç maddesini reaktöre taşıyan gaz olarak genelde He, Ar ve N₂ gibi inert özellik taşıyan gazlar kullanılmaktadır [78, 88-90].

1.9.1.1.2. Hidrojen redüksiyonu yöntemi

Bu yöntemde metalik nanopartiküllerin üretimi yapılmaktadır. Gaz fazında indirgeme işlemi uygulanması esasına dayanmaktadır. Başlangıç çözeltisi hazırlandıktan sonra buharlaştırılır. Buhar fazındaki çözelti taşıyıcı gaz yardımıyla artan sıcaklık yönünde taşınır. Bu taşınma sırasında nanopartikül üretimi gerçekleştirilir. Hidrojen gazı bu işlemler esnasında indirgeyici ve taşıyıcı gaz olarak kullanılabilir [78].

1.9.1.1.3. Asal gaz yoğunlaştırma yöntemi

Bu yöntemde nanopartikül formundaki metaller ve alaşımlar aşırı doymuş buhar fazı yardımıyla elde edilmektedir. Buharlaşmaya tabii olan atom ve moleküller ısı kaynağının etrafında aşırı doymuş hale gelirler. Buhar fazındaki başlangıç maddesi ile gaz molekülleri etkileşerek partikül oluşumunu gerçekleştirirler. Hızlı soğutma yardımıyla da çok ince nanopartiküller elde edilmektedir [78].

1.9.1.1.4. Mikroheterojen sistemler yardımıyla nanopartikül eldesi

Yukarıdan aşağı nanoartikül üretilmesi esasına göre nanopartiküllerin elde edildiği bir yöntemdir. Kullanılan sistemler, sıvı kristaller, jeller, misel çözeltileri, mikroemülsiyonlar olabilmektedir. İlk olarak elde edilmek istenen nanopartiküle uygun mikroheterojen sistemin seçimi gerçekleştirilmektedir. Daha sonra kullanılacak reaktantların sisteme uygunluğu kontrol edilir. Yapılan işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirilmektedir [78].

1.9.1.1.5. Alev sentezi ile nanopartikül eldesi

Bu yöntem ticari olarak kullanılacak olan nanopartiküllerin eldesinde uygulanmaktadır. Ticari olarak kullanımda tercih edilmesinin nedeni, kimyasal bileşim aralığının, partikül boyutlarının ve dağılımının kontrol edilebilir olmasıdır. Maliyetinin düşük olması da bir diğer tercih edilme nedenidir. Yöntemde genel olarak kullanılan başlangıç maddesi uçuculuğa sahip metal halejenürlerdir [78].

1.9.1.1.6. Mekanik aşındırma ile nanopartikül eldesi

Alaşımların ve faz karışımlarının nanopartikül formuna getirildiği sentez yöntemidir. Yukarıdan aşağıya nanopartikül sentez yaklaşımına uygun olarak gerçekleştirilmektedir. Nanopartiküller atom ve moleküler düzeyde bulunan büyük tanecik yapısına sahip parçacıkların plastik deformasyon sonucu nanopartikül formuna dönüşmesi ile elde edilirler. Bu yöntem ile genel olarak alaşımların, seramik ve kompozitlerin nano yapıda eldesi gerçekleştirilmektedir [78].

1.9.1.1.7. Ultrasonik sprey piroliz ile nanopartikül eldesi

Küresel ve deforme olmamış, farklı boyutsal aralığa sahip, birçok kimyasal bileşimde nanopartikül elde etmek için kullanılan bir tekniktir. Çözelti olarak yüksek saflığa sahip metal tuzları kullanılmaktadır. Başlangıç çözeltisinde birbirinden ayrı damlacıkların aerosol formunda oluşumu gerçekleştirilir. Daha sonra ısı parçalanma ve faz değişimi basamakları uygulanmaktadır. Aerosol buharı, yüksek sıcaklığa maruz bırakılır ve damlacıkların buharlaşması ve parçalanması gerçekleştirilir. Elde edilen nanopartiküllerin özelliği, damlacık boyutuna, başlangıç çözeltisine ve sıcaklığa bağlıdır [78, 91-99].

1.9.1.1.8. Rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi

ANADOLUCA yöntemi (ANADOLUCA-AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach) rutenyum tabanlı, ışıığa duyarlı, amino asit monomer ve oligomerlerinin sentezi, ışıığa duyarlı proteinlerin konjugasyonu ve çapraz bağlanmaları süreçlerinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir [100].

ANADOLUCA yönteminde; proteinlerde bulunan sistein, triptofan ve tirozin aminoasitleri ile rutenyum tabanlı amino asit monomerlerinin arasında çapraz bağlı konjugasyon işlemleri gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin getirdiği en önemli

avantajlardan bir tanesi; elde edilen ışığa duyarlı monomerlerin nano ve mikro yapılarda denatüre olmadan kullanılabilmesidir.

ANADOLUCA yöntemi, silika materyallere, süperparamanyetik partiküllere, nanokristallere, karbon nanotüplere, Ag/Au nanopartiküllere ve Au yüzeylerine protein entegrasyonu yanı sıra proteinimsi polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında ve ilgili yüzeylerle entegrasyonuna da uygulanabilir. ANADOLUCA, yeniden ayrılabilir katı faz sistemleri, teranostikler (aynı anda tanı ve tedavi olanığı), nanoprotein taşıyıcılar, reseptör hedefli nanokargolar, biyosensörler, biyokataliz uygulamaları, yönetilebilir görüntüleme ve algılama teknolojileri gibi alanlarda kullanılabilen yeni nesil nanobiyokonjugantların oluşturulduğu bir yöntemdir [101].

ANADOLUCA; pH ve sıcaklıktan bağımsız, kataliz ve tayin amacıyla kullanılabilen bir yöntemdir. Bu teknikle elde edilen nano-biyokonjugantlarda bulunan proteinlerin fonksiyonu ve konformasyonları etkilenmez [100].

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Nanoenzim sentezi sırasında; fotosensitif monomer bis (2-2'-bipiridil) (MATyr)₂ rutenyum, asetilkolinesteraz (AChE), amonyum persülfat (APS), polivinil alkol (PVA), saf su ve azot gazı kullanılmıştır.

QCM sensör hazırlanırken; toluen, stiren, maleik anhidrid, azobisisobutironitril (AIBN), dimetil sülfoksit (DMSO), dimetilformamid (DMF), 1,4-fenildiamin, gluteraldehit, horseradish peroksidaz (HRP), tetrametil benzidin (TMB), 4-aminotiyofenol, paraokson ve saf su kullanılmıştır.

Potansiyometrik sensör hazırlanırken; L-Serin, NaOH, metakriloil benzotriazol (MA-Bt), 1,4-dioksan, HCl, etilediamintetraasetik asit (EDMA), AIBN, hekzadekan, sodyum dodesil sülfat (SDS), dibütil ftalat, paraokson ve saf su kullanılmıştır.

Reflaktometrik interferans spektroskopisi temelli sensör hazırlanırken; N-hidroksisüksinimid (NHS), (3-Dimetillaminopropil)-N'-etilkarbodiimid (EDC), etanolamin, HCl, glisin, paraokson ve saf su kullanılmıştır.

Tampon çözelti olarak; Na₂CO₃/HCO₃ (pH=9), H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ (pH=7), 4-(2-hidroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, pH= 7,4) kullanılmıştır. Tez çalışmalarında kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından temin edilmiştir. Saf su elde etmek için Thermo Scientific Barnstead™ Smart2Pure™ saf su cihazı kullanılmıştır. Kullanılan saf suyun iletkenliği 18 megaohmcm⁻¹'dir.

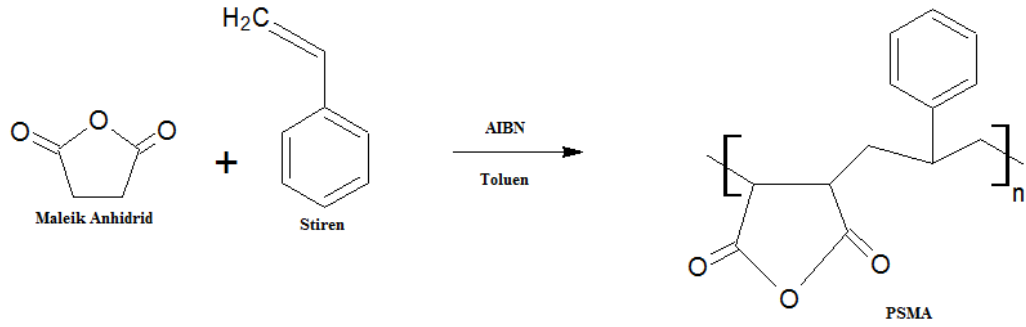
2.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Bu çalışmada QCM ölçümleri; Maxtek RQCM kristal analizörü ile, floresans ölçümleri; Varian Cary Eclipse marka spektrofotometre cihazı ile, potansiyometrik ölçümler; Mettler Toledo S220 pH/iyon metre cihazı ile yapılmıştır. Elektro-çekme işleminde pompa olarak KDS100 Infusion Syringe Pump, güç kaynağı olarak ise TT-Technic MCH-305D kullanılmıştır. Reflaktometrik interferans spektroskopisi ölçümleri için Analytic Jena marka, Biaffinity, Jena, Almanya model spektrofotometre kullanılmıştır. Elde edilen nanopartiküller ve nanoliflerin taramalı elektron mikroskopisi (SEM) görüntüleri Carl Zeiss marka SEM cihazı ile alınmıştır. pH ölçümleri WTW Series InoLab pH730 model pH metre ile yapılmıştır.

2.3. QCM Sensörün Hazırlanışı

2.3.1. Poli(stiren-alt-maleik anhidrid) polimerinin sentezi

Poli(stiren-alt-maleik anhidrid) (PSMA) sentezi için Cecile ve arkadaşlarının çalışmasındaki yöntem kullanılmıştır [102]. Bu yönteme göre öncelikle 60 mL toluen alınarak 3,5 mL stiren ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışımın üzerine 2,99 g maleik anhidrid eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda 10 dakika karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra son olarak azobisisobutironitril (AIBN)'den 0,01 g ilave edilerek polimerizasyon için karışım 90 °C'de 4 saat karıştırıcıya konulmuştur. Polimerizasyon sırasında Şekil 2.1'de gösterilen reaksiyon meydana gelmiştir.



Şekil 2.1. PSMA'nın sentez tepkimesi

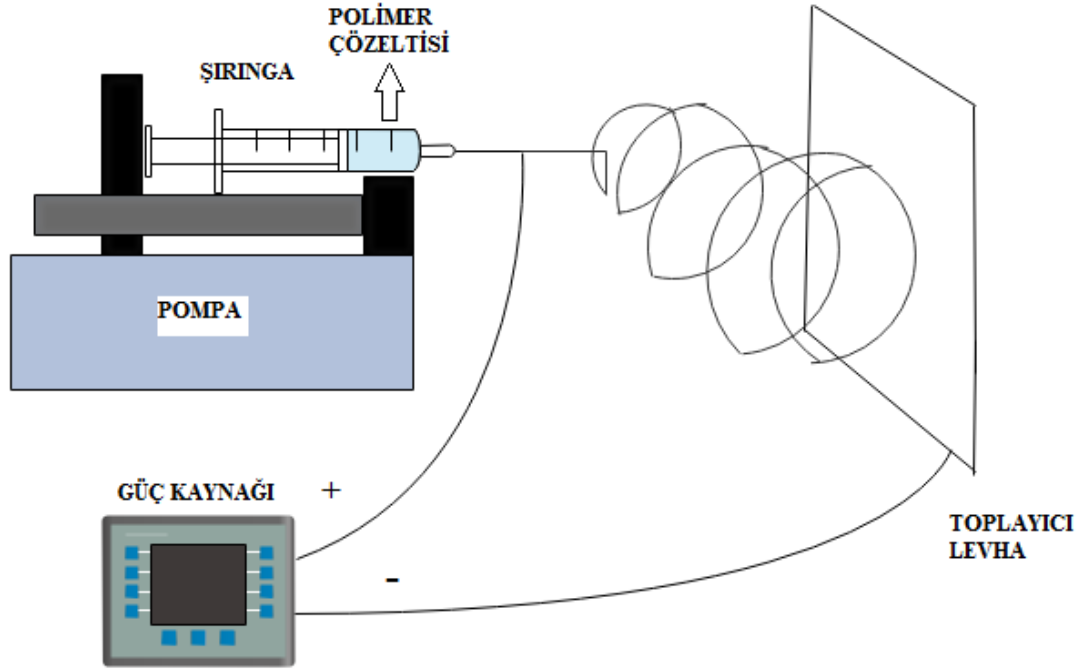
4 saatin sonunda elde edilen PSMA polimeri çözeltinin içerisinde süzülerek alınmıştır. Daha sonra elde edilen polimer toluen ile 5 kez yıkamaya tabii tutulmuştur. Yıkama işleminden sonra polimer kuruması için oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir.

2.3.2. Elektro-çekme yöntemiyle nanolif elde etmek için PSMA çözeltilerinin hazırlanması

PSMA polimerinden nanolif eldesinde çözelti hazırlanırken iki farklı çözücü kullanılmıştır. Bunlar; dimetil sülfoksit (DMSO) ve dimetilformamid (DMF) olarak belirlenmiştir. Bu çözücüler kullanılarak PSMA'nın 3 farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Bunlar; %30(wt/wt) PSMA/DMSO, %30(wt/wt) PSMA/DMF ve %15(wt/wt) PSMA/%2,5(wt/wt) PVA/DMSO'dur. Bu çözeltilerin her birinden 40 mL hazırlanmış ve her elektro-çekme işlemi için 2 mL'si kullanılmıştır.

2.3.3. Elektro-çekme düzeneğinin kurulması

Elektro-çekme işleminde 30 kV kapasitesinde doğru akım üreten güç kaynağı kullanılmıştır. Oluşan liflerin toplanması için toplayıcı levha olarak 10x10 cm² boyutlarında kesilen alüminyum folyolar kullanılmıştır. Lif oluşturmak için hazırlanan çözelti şırıngaya çekildikten sonra, şırınga pompa düzeneğine yerleştirilmiştir. Güç kaynağının pozitif ucu metal şırınga iğnesine takılmıştır. Topraklı olan elektrot ise toplayıcı levhaya takılmıştır. Deney düzeneğinin şematik gösterimi Şekil 2.2’de, laboratuvar ortamındaki kurulumu Şekil 2.3’de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.2. Elektro-çekme deney düzeneğinin şematik gösterimi



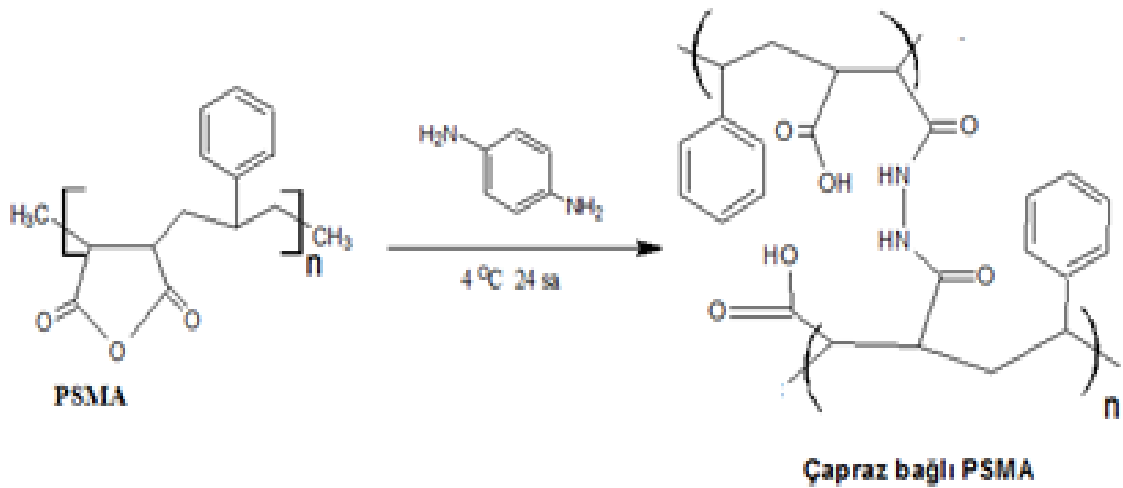
GörSEL 2.1. Laboratuvar ortamındaki elektro-çekme düzeneğinin kurulumu

2.3.4. Elektro-çekme sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi

Elektro-çekme işlemiyle amaçlanan, toplayıcı levha üzerinde nanolif elde edilmesidir. Elde edilen nanolifin içerisinde boncuksu yapıların bulunması istenmemektedir. Bundan dolayı sistemin çalışma şartlarının çok iyi belirlenmesi gerekmektedir. Şırınga ve toplayıcı levha arasındaki mesafe 10 cm’de sabit tutularak, uygulanan potansiyel ve akış hızı değiştirilmiştir. 5-7 kV potansiyel aralığı ve 1-2 mL/h akış hızı aralığında çalışılarak en uygun nanolif elde edilmeye çalışılmıştır. Elektro-çekme süresi 10 dakika olarak uygulanmış ve elde edilen nanolifler taramalı elektron mikroskopisi (SEM)’de analiz edilerek optimum çalışma şartları belirlenmiştir.

2.3.5. Elde edilen PSMA nanoliflerinin çapraz bağlanması

Elektro-çekme işlemi sonrasında elde edilen nanolifler; birim hacme düşen lif yoğunluğunu arttırmak ve sudaki çözünürlüğü azaltmak için çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak 1,4-fenildiamin kullanılmıştır. Bunun için öncelikle 0,1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3$ (pH=9) çözeltisinden 10 mL hazırlanmıştır. 1,4-fenildiamin çapraz bağlayıcısından 0,7420 g alınarak 10 mL $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3$ içerisinde çözölmüştür. Çapraz bağlanacak nanoliften 0,25 g tartılarak çapraz bağlayıcı çözeltisine batırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan nanolif çözeltisi çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi için 4 °C’de 24 saat süreyle bekletilmiştir. Nanoliflerin çapraz bağlanma tepkimesi Şekil 2.4’de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. PSMA'nın çapraz bağlanması tepkimesi

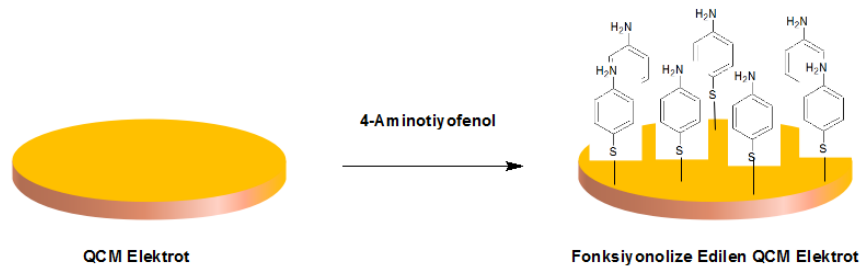
2.3.6. Çapraz bağlı PSMA nanoliflerine HRP(Horseradish Peroksidaz) enzim immobilizasyonu

Hazırlanan çapraz bağlı nanoliflere, enzim immobilizasyon performansını tespit edebilmek amacıyla, ilk olarak HRP enzimi immobilize edilmiştir. Enzim immobilizasyonu öncesinde çapraz bağlı nanolifleri immobilizasyona aktif hale getirmek için gluteraldehit kullanılmıştır. Bunun için öncelikle gluteraldehitin %10(v/v)'luk sulu çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 12,5 mL alınmış ve 0,25 g PSMA nanolifinden elde edilen çapraz bağlı nanolifler bu çözeltiye batırılmıştır. Nanolifler bu şekilde 4 °C sıcaklık altında 1 saat bekletilmiştir. 1 saatin sonunda reaksiyona girmeyen gluteraldehitin uzaklaştırılması amacıyla nanolifler çıkarılarak saf suya konulmuş ve 4 °C'de 2 gün beklemeye bırakılmıştır.

HRP enzimi immobilizasyonunda kullanılmak için $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ (pH=7) tamponu hazırlanmıştır. 65,7 mg HRP enzimi 1 ml $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ tamponunda çözülerek stok çözelti elde edilmiştir. Stok çözeltiden 190,2 µL alınıp tampon çözeltiyle 25 mL'ye seyreltilmiştir. Çapraz bağlı nanolifler HRP çözeltisinin 12,5 mL'sine batırılarak 4 °C'de 20 saat bekletilmiştir. Enzim immobilizasyonu sonrasında nanolifler HRP enziminin substratı olan TMB (Tetrametil benzidin) ile etkileştirilmiştir.

2.3.7. Kuvars elektrot yüzeyinin fonksiyonelize edilmesi

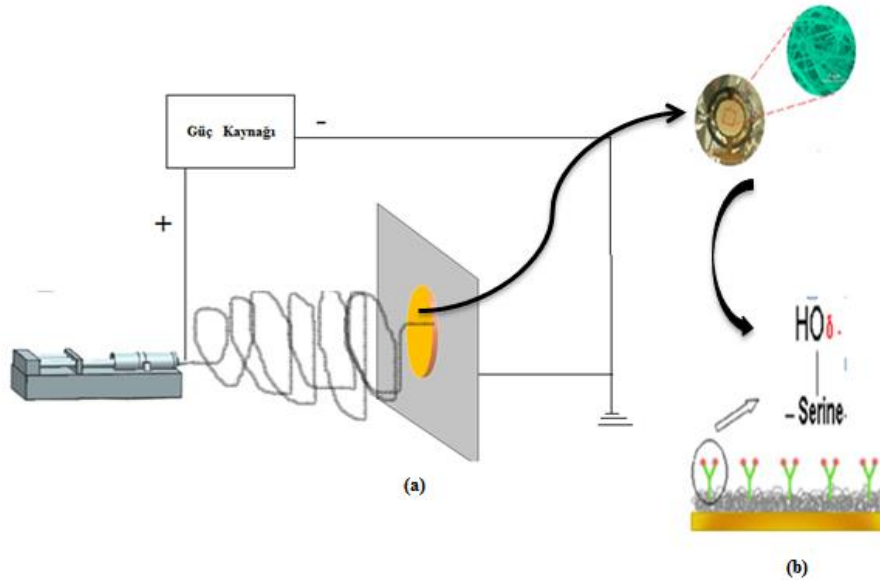
Kuvars elektrotun yüzeyine enzim immobilize nanoliflerin bağlanabilmesi için öncelikle elektrot yüzeyinin fonksiyonelize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 4-aminotiyofenol etanolde çözülerek 10 mM'lık çözeltisinden 10 mL hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti enjektör içerisine alınmıştır. Enjektördeki bu çözelti kuvars elektrotun altın yüzeyine peristaltik pompa kullanılarak 30 dakikada bir, 1 mL olacak şekilde damlatılmıştır. Bu işlem 5 saat boyunca devam ettirilmiştir. Yüzeyin fonksiyonelleştirilmesi işleminin şematik gösterimi Şekil 2.5'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.5. QCM elektrotun 4-aminotiyofenol ile fonksiyonelize edilişi

2.3.8. QCM elektrot yüzeyinde tanıyıcı tabakanın oluşturulması

%30'luk(wt/wt) PSMA/DMSO çözeltiden 4 mL alınarak üzerine bis (2-2'-bipiridil) (MATyr)₂ rutenyum (MAT-Ru(bipy)₂-MAT)'dan 1 ml eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra mevcut çözeltinin üzerine 100 ppm asetilkolinesteraz enziminin 0,38 µL ilave edilmiştir. Enzim ilavesinden sonra çözelti oda sıcaklığında 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karıştırma işleminin bitmesinin ardından 0,5 gram amonyum persülfat ilave edilmiştir. Elde edilen son çözelti oda sıcaklığında 1 saat karıştırmaya bırakılmıştır. Karıştırma işleminden sonra çözelti şırınga içerisine çekilerek elektro-çekme düzeneğindeki pompaya takılmıştır. Toplama levhasına QCM elektrot yerleştirilerek elektro-çekme işlemi uygulanmıştır. Yapılan işlemlerin şematik gösterimi Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. QCM elektrot yüzeyinde tanıyıcı tabakanın oluşturulma şeması (a) elektro-çekim düzeneği, (b) enzim immobilize nanolif ile kaplanmış QCM elektrot

Daha sonra nanolif ile kaplanmış elektrot QCM cihazına yerleştirilerek farklı derişimlerde paraokson çözeltisi ile etkileşimi incelenmiştir. Bunun için paraoksonun 0,1-10 ppm arasında değişen %50(v/v) metanol içeren sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Analitin elektrot yüzeyiyle etkileştikten sonraki frekans değişimi ölçülmüştür.

μL , paraokson çözeltilerinden 1 mL alınarak toplam karışım deiyonize su ile 3 mL'ye seyreltilmiştir. Elde edilen çözelti floresans cihazının küvetine konulmuş ve ölçümler alınmıştır. Ölçümler yapılırken numune 300-625 nm dalga boyu aralığında değişen ışınlarla uyarılmış ve maksimum şiddet elde edilen dalga boyu çalışma için seçilmiştir.

2.4.3. Uygun çalışma pH'sının belirlenmesi

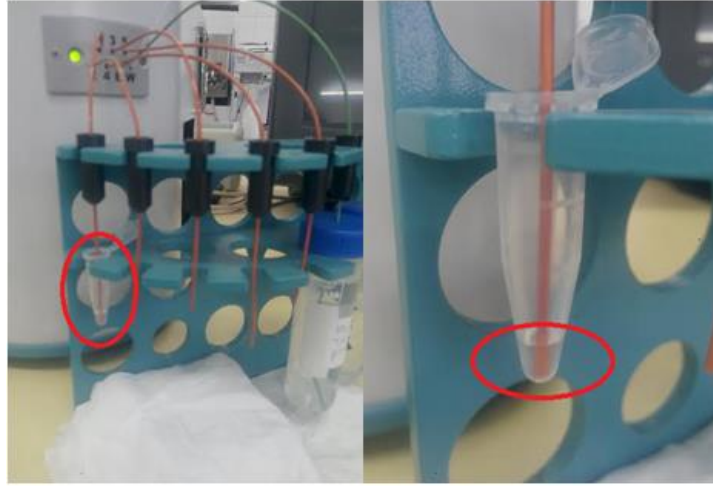
100 μL nano AChE üzerine 1 mL 10 ppm paraokson çözeltisi eklendikten sonra farklı pH'lardaki tampon çözeltiler ile toplam hacim 3 mL'ye seyreltilmiştir. Elde edilen çözelti çalışılan dalga boyundaki ışınla uyarılarak floresans şiddetleri karşılaştırılmıştır.

2.5. Refraktometrik İnterferans Spektroskopisi (RIFS)

2.5.1. CMD (Karboksimetildekstran) çip yüzey aktivasyonu

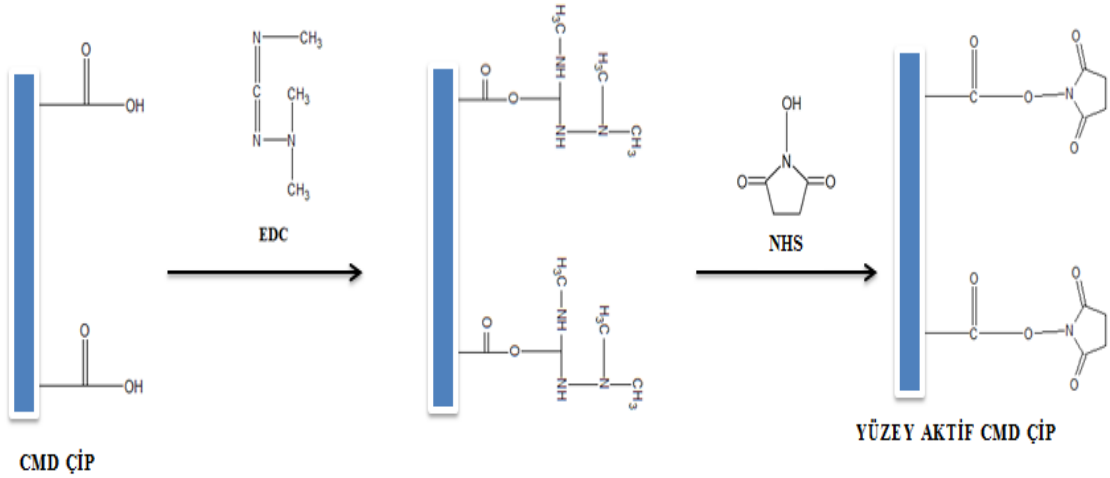
RIFS cihazına ilk olarak yıkama çipi yerleştirilmiştir. Cihaz saf su ile 10 dakika boyunca yıkamaya tabii tutulmuştur. Ardından saf su yerine hazırlanan HEPES tamponu yerleştirilerek sistem 10 dakika boyunca tamponla yıkanmıştır. Saf su ve tamponla yıkama işlemi sona erdikten sonra yıkama çipi çıkarılarak immobilizasyon yapılacak olan CMD çip takılmıştır. Akış hızı 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ olarak ayarlanmış ve iki kanaldan geçirilecek şekilde 10 dakika boyunca çip yüzeyinden HEPES tamponu geçirilmiştir.

Tampon geçişinden sonra sistemde hava kabarcığı olup olmadığını tespit maksadıyla ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonucunda sistemde bir sorun olmadığı tespit edildikten sonra 0,1 M N-hidroksisüksinimid (NHS) ve 0,1 M 3-dimetillaminopropil-N'-ethilkarbodiimid (EDC)'den hacimce 1:1 oranında hazırlanan 70 μL çözelti cihaza Şekil 2.8'de gösterildiği gibi yerleştirilmiştir. Sistemde hava kabarcığı istenmediğinden dolayı çözeltiyi çekecek olan kablonun ependorfun dibine kadar daldırılmasına dikkat edilmiştir. Akış hızı 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ olarak ayarlanarak ve çip yüzeyinden çözelti geçişine başlanmıştır.



Görsel 2.2. NHS/EDC çözeltisinin çip yüzeyine verilmesi

NHS/EDC çözeltisinin çip yüzeyinden geçişi bittikten sonra yüzey aktivasyonu tamamlanmıştır. Yüzey aktivasyonunun şematik gösterimi Şekil 2.9’da verilmiştir.

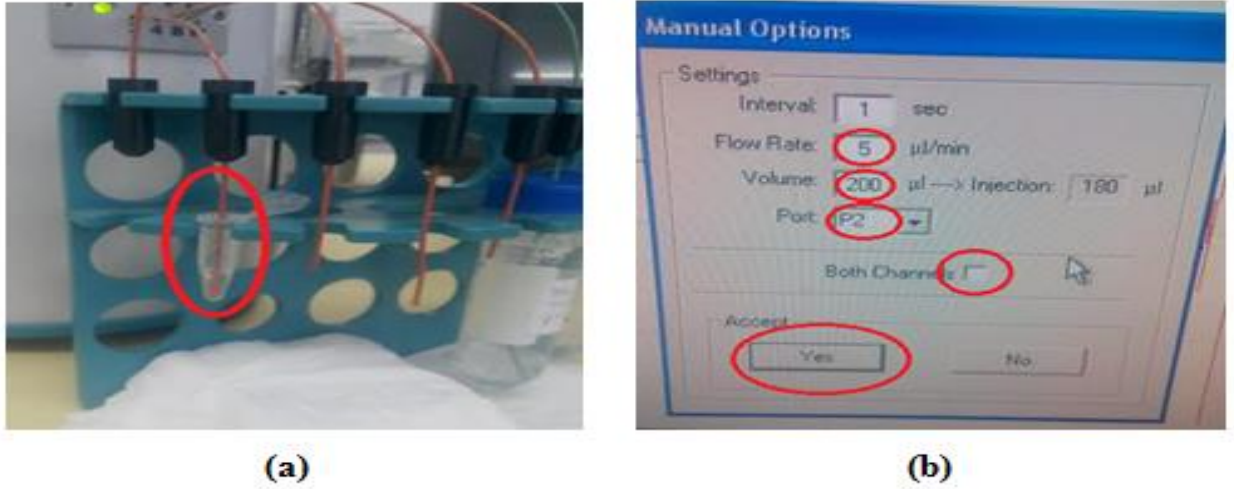


Şekil 2.9. CMD çipin yüzey aktivasyonunun şematik gösterimi

2.5.2. CMD çip yüzeyine AChE immobilizasyonu

Yüzey aktivasyonu tamamlandıktan sonra 1 ppm AChE enziminden 100 μ L hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti ependorfa alınarak RİFS cihazındaki 2 nolu girişe yerleştirilmiştir. Akış hızı 5 μ L/min ve hacim 200 μ L olarak ayarlanmıştır. Çözelti akışı tek kanaldan geçirilecek şekilde yapılmıştır. Böylece çip yüzeyinin bir bölümüne enzim immobilize edilmeyerek referans yüzey oluşumu sağlanmıştır. Bu çalışma koşulları

altında enzim çözeltisi çip yüzeyinden 40 dakika boyunca geçirilmiştir. Spektrometredeki enzim immobilizasyonu parametreleri Şekil 2.10’da verilmiştir.



Görsel 2.3. CMD çip yüzeyine AChE immobilizasyonu (a) enzim çözeltisi (b) sistem parametreleri

Enzim geçişi tamamlandıktan sonra 70 µL etanolamin çözeltisi alınarak 3 nolu girişe yerleştirilmiştir. Akış hızı 5 µL/min ve hacim 70 µL olarak ayarlanarak çözelti çip yüzeyinden geçirilmiştir. İmmobilizasyon işleminin bitiminden sonra temel sinyalde oluşan değişim incelenerek immobilizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğine karar verilmiştir.

2.5.3. Paraokson çözeltilerinin çip yüzeyine uygulanarak ölçümlerinin yapılması

Çip yüzeyine AChE enzim immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra farklı derişimlerde paraokson çözeltilerinin analizi yapılmıştır. Bu analizler için hazırlanan paraokson çözeltileri Şekil 2.11’de gösterildiği gibidir.

ppm	Molarite
0,01	$3,6 \times 10^{-8}$
0,1	$3,6 \times 10^{-7}$
1	$3,6 \times 10^{-6}$
10	$3,6 \times 10^{-5}$
50	$1,8 \times 10^{-4}$
100	$3,6 \times 10^{-4}$
150	$5,4 \times 10^{-4}$
200	$7,2 \times 10^{-4}$

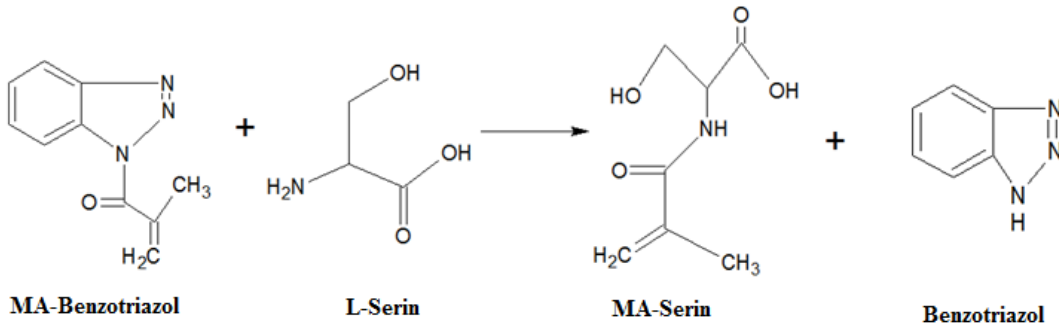
Şekil 2.11. Hazırlanan paraokson çözeltileri

Ölçüm yapılmaya başlanmadan önce enzim immobilize çip cihaza ölçüm pozisyonunda takılmıştır. 10 dakika boyunca 10 µL/min akış hızında HEPES tamponu çip yüzeyinden geçirilmiştir. Tampon akış hızı 10 µL/min olarak ayarlanarak sistem manuel moddan otomatik moda alınmıştır. 1 nolu girişe paraokson çözeltisinden 200 µL konulmuştur. 2 nolu girişe 50 µL glisin, 3 nolu girişe 50 µL HCl çözeltisi ise çip yüzeyine bağlanan paraokson moleküllerinin rejenerasyonu için konulmuştur. Bu şekilde farklı analit derişimleri için ölçümler alınmıştır.

2.6. Potansiyometrik Sensör

2.6.1. N-metakriloil-(L)-Serin (MA-Serin) monomerinin sentezi

N-metakriloil-(L)-Serin sentezi için uygulanan yöntemde; öncelikle 0,56 g L-Serin alınarak üzerine 1N NaOH çözeltisinden 5,5 mL eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan çözelti üzerine 10 mL saf su eklenerek 10 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırmaya bırakılmıştır. Bu işleme paralel olarak 1 g metakriloil benzotriazol (MA-Bt) alınıp 20 mL 1,4-dioksan içinde karıştırılarak çözülmüştür. Metakriloil benzotriazolün 1,4-dioksan içerisinde çözülerek hazırlanan çözeltisi, ilk başta hazırlanan L-Serin çözeltisine damla damla eklenmiştir. Bu esnada Şekil 2.12'deki reaksiyon meydana gelmiştir.



Şekil 2.12. MA-Serinin sentez reaksiyonu.

Reaksiyonun tamamlanıp tamamlanmadığı kağıt kromatografisi yardımıyla belirlenmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra deney ortamındaki 1,4-dioksan uçurularak uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırma işleminden sonra ekstraksiyon aşamasına geçilmiştir. Ekstraksiyonda çözücü olarak etilasetat kullanılmıştır. Ortamdaki benzotriazol, etilasetat fazında kalırken, su fazında MA-Serin kalmaktadır. Su fazı

ortamdan ayrılmış ve üzerine pH 5-6 oluncaya dek hidroklorik asit ilave edilmiştir. Son olarak ortamdaki çözücü buharlaştırılıp MA-Serin elde edilmiştir.

2.6.2. Paraokson baskılı polimer hazırlanması

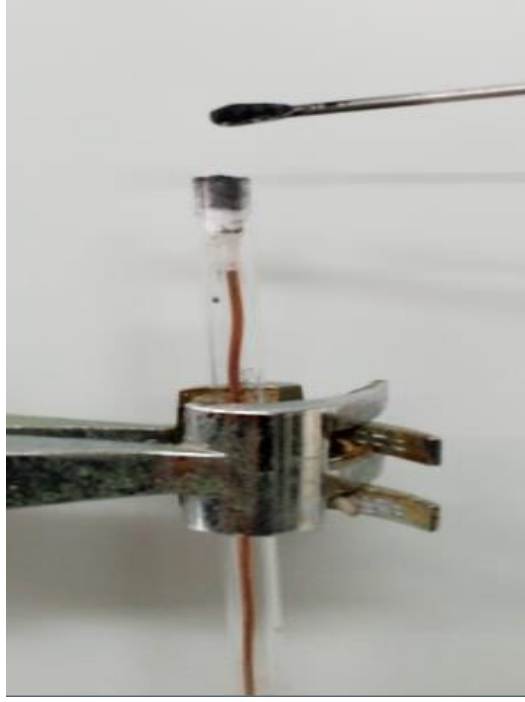
5 mmol MA-Serin çözeltisinden 500 µL hazırlanmıştır. Bu çözeltinin üzerine 5 mL metanol eklenerek 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra 9 mmol'lük EDMA(Etilendiamintetraasetik asit) çözeltisinden 1,702 mL, 80 µL heksadekan ve 80 mg AIBN eklenerek 10 dakika karıştırma işlemine tabii tutulmuştur.

Hazırlanan bu çözelti organik faz olarak adlandırılmaktadır. Bu işleme paralel olarak 0,5 mmol paraokson çözeltisinden 1 mL hazırlanmıştır. 38,5 mg SDS(Sodyum dodesil sülfat) 13 mL suda çözüldükten sonra üzerine paraokson ilave edilmiştir. 15 dakikalık süre boyunca çözelti karıştırıcıya konulmuştur. Hazırlanan bu çözelti su fazı olarak adlandırılmaktadır. Organik fazın üzerine su fazı ilave edilerek 1 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletilmiştir.

Son elde edilen çözelti polimerleşme reaksiyonu için 18 saat süreyle 65 °C'lık su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan alınan çözelti santrifüjlenerek paraokson baskılı polimer ortamdan alınmıştır. Alınan polimer 3 kez saf su ile 3 kez de KOH ile yıkanarak paraokson molekülü polimerden uzaklaştırılmıştır. Böylece paraokson molekülüyle aynı boyutsal özelliklere sahip kalıp elde edilmiştir. Elde edilen paraokson baskılı polimer oda koşullarında 1 gün boyunca kurumaya bırakılmıştır.

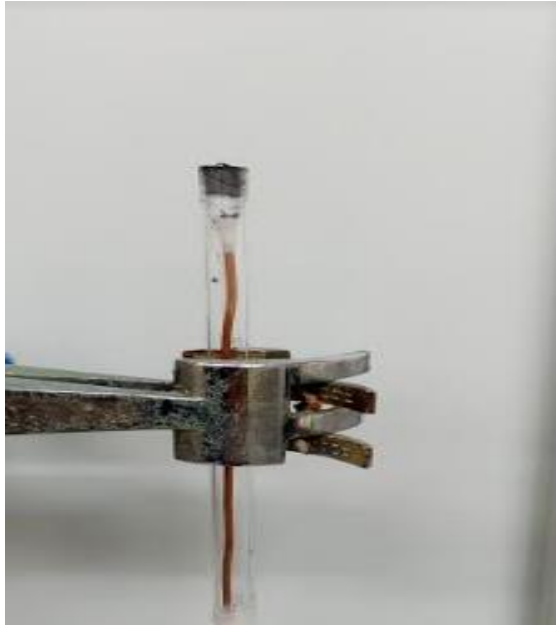
2.6.3. Paraokson seçici elektrotun hazırlanması

Hazırlanan paraokson baskılı polimer havanda iyice dövülerek homojen toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen polimerden 5 mg alınarak üzerine 40 mg aktif kömür ilave edilmiştir. Elde edilen katı karışıma 100 µL dibütil ftalat konularak homojen bulamaç elde edinceye kadar karıştırılmıştır. Bulamaç Şekil 2.13'de görüldüğü gibi cam elektrotun uç kısmına doldurulmuştur.



Görsel 2.4. *Elektrotun molekül baskılanmış polimer içeren bulamaç ile doldurulması*

Elektrotun uç kısmındaki boşluğun elde edilen bulamaç ile tamamen dolmasına ve dış kısmının pürüzsüz olmasına dikkat edilmiştir. Ardından hazırlanan elektrot Şekil 2.14’de gösterildiği gibi uç kısmı yukarıda olacak biçimde bir spora tutturularak kuruması için bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir.



Şekil 2.14. *Kuruması için oda sıcaklığında bekletilen elektrot*

Elektrot hazırlandıktan sonra ilk olarak şartlandırma işlemi uygulanmıştır. Bu işlem sonucunda; analiz süresi, rejenerasyon süresi ve elektrolit dengesinin tamamlandığı süre belirlenmiştir. Şartlandırma işlemi tamamlandıktan sonra çalışma pH'sını belirlemek için pH 2-12 arasında çözeltiler hazırlanmıştır. Bu pH aralığında ölçümler alınarak optimum pH belirlenmiştir. 0,01-200 ppm arasında değişen paraokson numuneleri için ölçümler belirlenen pH değerinde alınmış ve ardından kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

3.6.3. BULGULAR VE YORUM

3.1. QCM Sensör İle İlgili Elde Edilen Bulgular

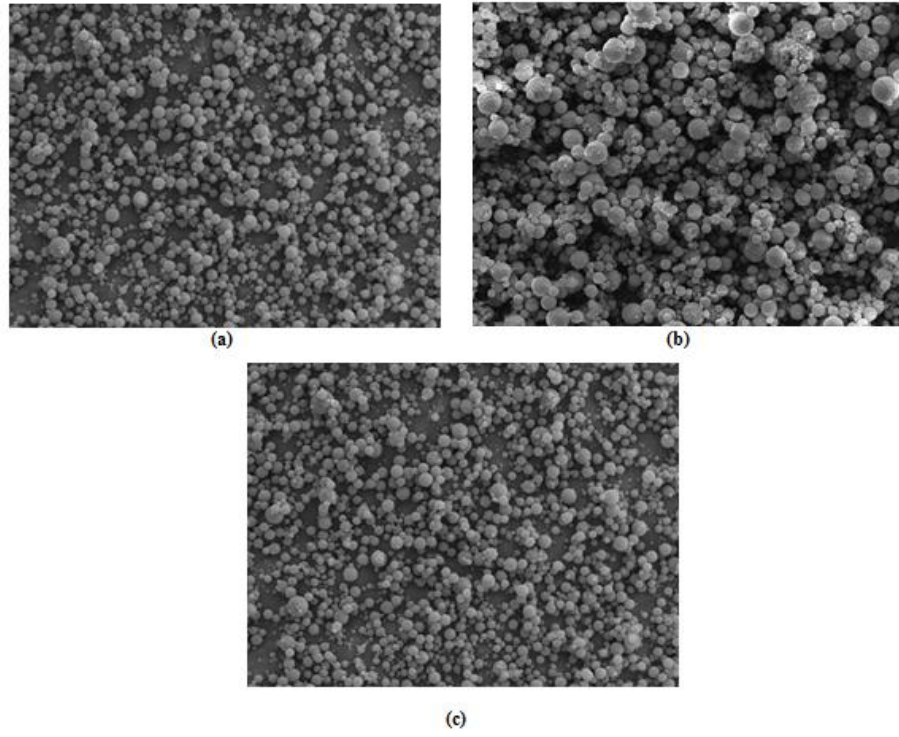
3.1.1. Elektro-çekme sisteminin çalışma şartları

Elektro-çekme işleminde optimum çalışma şartlarının belirlenmesi amacıyla farklı koşullarda nanolifler elde edilmiş ve bunların SEM görüntüleri incelenmiştir. Bunun için farklı çözücü ortamları, 1-2 mL/h aralığında değişen akış hızları, 5-7 kV aralığında değişen potansiyeller denenmiştir. Ön çalışma yapılan şartlar %30(wt/wt) PSMA/DMSO, %30(wt/wt) PSMA/DMF ve %15(wt/wt) PSMA/%2,5(wt/wt) PVA/DMSO çözeltileri için Şekil 3.1’de gösterildiği gibidir. Bu denemelerin sonucunda; homojen lif çapına sahip, boncuksuz yapıda ve sürekli olarak nanolif elde edilmesi amaçlanmıştır.

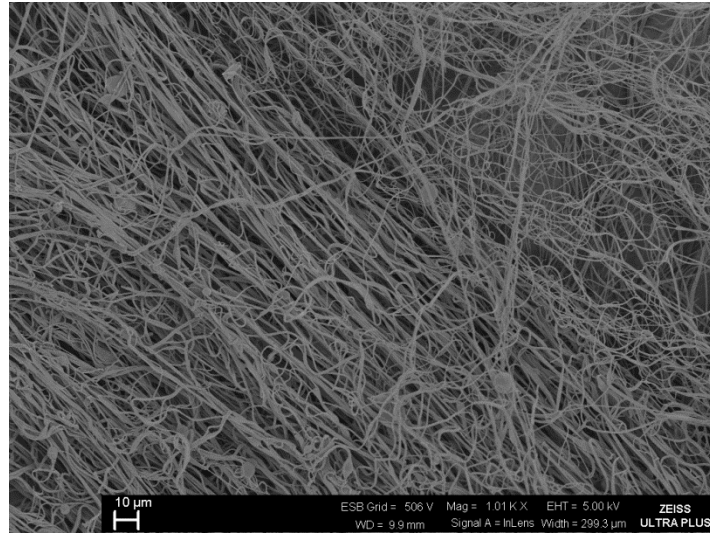
(1) P: 5 kV F: 1 mL/h D: 10 cm	(2) P: 5 kV F: 1,5 mL/h D: 10 cm	(3) P: 5 kV F: 2 mL/h D: 10 cm
(4) P: 6 kV F: 1 mL/h D: 10 cm	(5) P: 6 kV F: 1,5 mL/h D: 10 cm	(6) P: 6 kV F: 2 mL/h D: 10 cm
(7) P: 7 kV F: 1 mL/h D: 10 cm	(8) P: 7 kV F: 1,5 mL/h D: 10 cm	(9) P: 7 kV F: 2 mL/h D: 10 cm

Şekil 3.1. Ön çalışma yapılan şartlar

%30(wt/wt) PSMA/DMSO çözeltisi için belirlenen şartlarda ön çalışma yapılmıştır. Elde edilen nanolifler SEM’de incelenmiştir. İnceleme sonucunda istenen nanoliflerin 5 kV potansiyelinde ve 1 mL/h akış hızında elde edildiği görülmüştür. Diğer şartlarda elde edilen nanoliflerin boncuklu yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Boncuklu yapıda olan nanoliflerin bazılarının SEM görüntüsü Şekil 3.2’de, 5 kV potansiyel ve 1 mL/h akış hızında elde edilen nanoliflerin SEM görüntüsü Şekil 3.3’de verilmiştir.



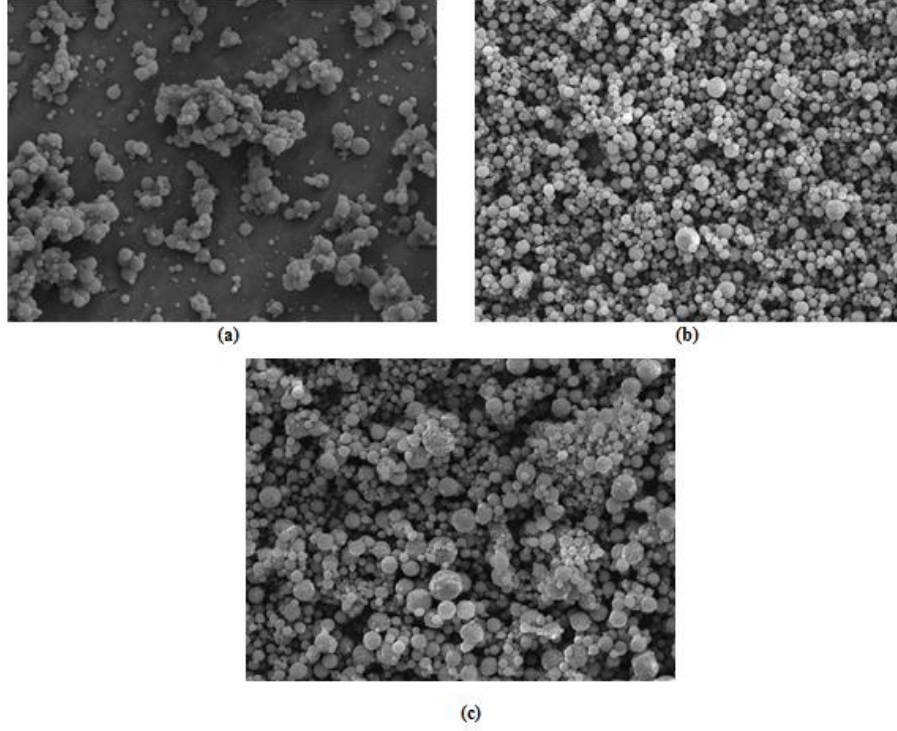
Şekil 3.2. %30(wt/wt) PSMA/DMSO çözeltisinden boncuklu yapıda elde edilen nanolifler (a) 5 kV, 2 mL/h (b) 6 kV, 1 mL/h (c) 7 kV, 1,5 mL/h



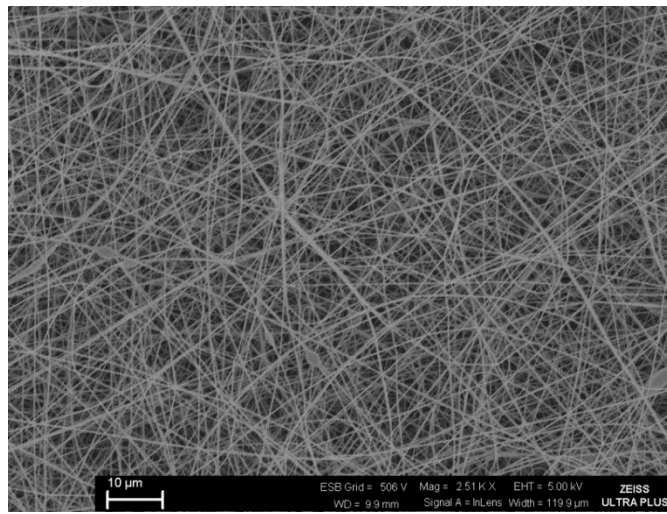
Şekil 3.3. %30(wt/wt) PSMA/DMSO çözeltisinden boncuksuz yapıda elde edilen nanolif (5 kV, 1 mL/h)

%30(wt/wt) PSMA/DMF çözeltisi için belirlen şartlarda ön çalışma yapılmıştır. Elde edilen nanolifler SEM cihazı ile incelenmiştir. İnceleme sonucunda istenen nanoliflerin 5 kV potasyelinde ve 1,5 mL/h akış hızında elde edildiği görülmüştür.

Diğer şartlarda elde edilen nanoliflerin boncuklu yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Boncuklu yapıda olan nanoliflerin bazılarının SEM görüntüsü Şekil 3.4’de, 5 kV potansiyel ve 1,5 mL/h akış hızında elde edilen nanoliflerin SEM görüntüsü Şekil 3.5’de verilmiştir.

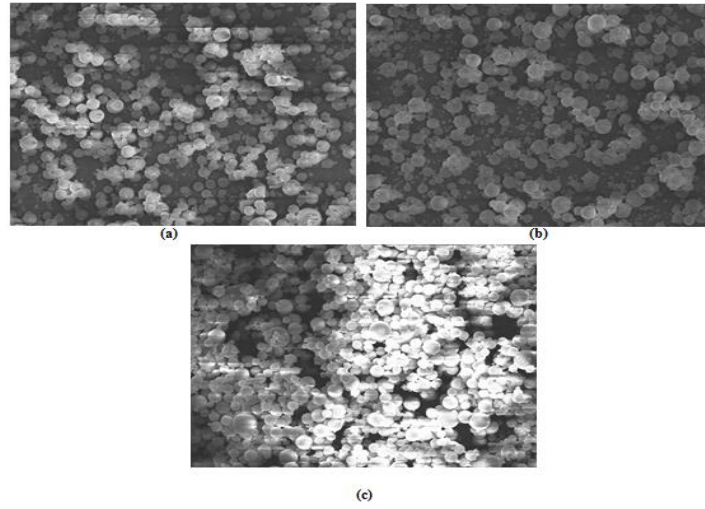


Şekil 3.4. %30(wt/wt) PSMA/DMF çözeltisinden boncuklu yapıda elde edilen nanolifler
(a) 5 kV, 1 mL/h (b) 6 kV, 1,5 mL/h (c) 7 kV, 2,0 mL/h

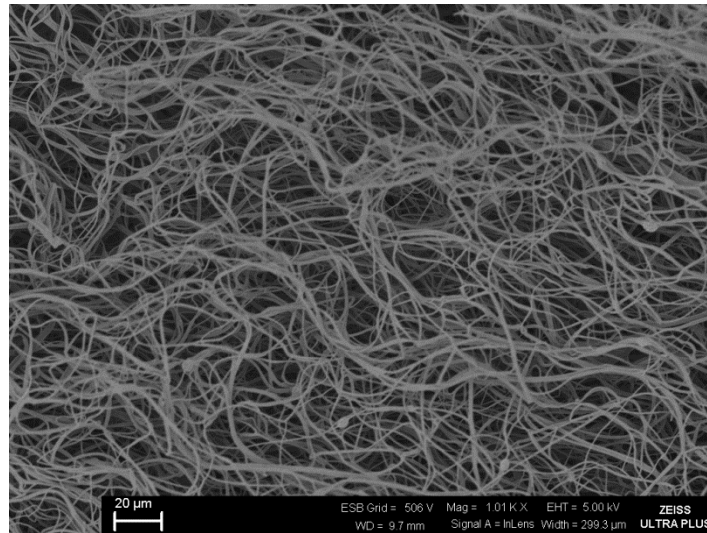


Şekil 3.5. %30(wt/wt) PSMA/DMF çözeltisinden boncuksuz yapıda elde edilen nanolif
(5 kV, 1,5 mL/h)

%15(wt/wt) PSMA/%2,5(wt/wt) PVA/DMSO çözeltisi için belirlen şartlarda ön çalışma yapılmıştır. Elde edilen nanolifler SEM’de incelenmiştir. İnceleme sonucunda istenen nanoliflerin 6 kV potansiyelinde ve 1 mL/h akış hızında elde edildiği görülmüştür. Diğer şartlarda elde edilen nanoliflerin boncuklu yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Boncuklu yapıda olan nanoliflerin bazılarının SEM görüntüsü Şekil 3.6’da, 6 kV potansiyel ve 1 mL/h akış hızında elde edilen nanoliflerin SEM görüntüsü Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.6. %15(wt/wt) PSMA/%2,5(wt/wt) PVA/DMSO çözeltisinden boncuklu yapıda elde edilen nanolifler (a) 5 kV, 1,5 mL/h (b) 6 kV, 2,0 mL/h (c) 7 kV, 1,0 mL/h

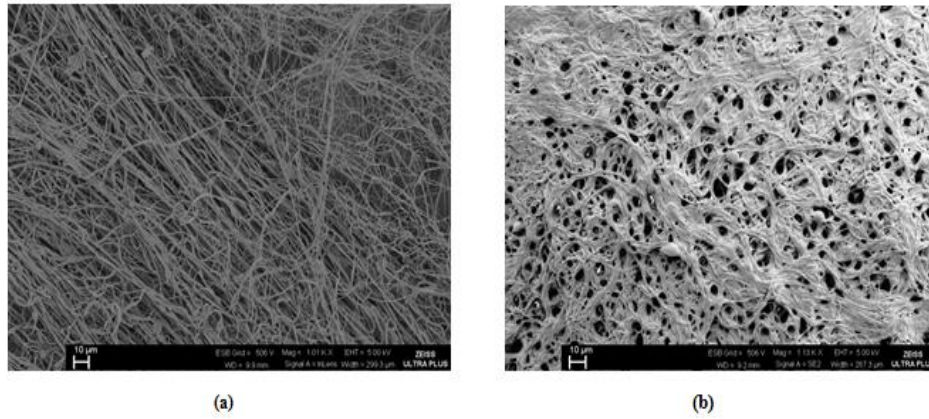


Şekil 3.7. %15(wt/wt) PSMA/%2,5(wt/wt) çözeltisinden boncuksuz yapıda elde edilen nanolif (6 kV, 1 mL/h)

Sonuçlar incelendiğinde 3 farklı çözeltiden de uygun çalışma şartlarında nanolif elde edilebildiği gözlemlenmiştir. Çalışmanın geri kalanında kullanılmak amacıyla elde edilen nanolifler lif yoğunluğu ve homojenliği açısından karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma neticesinde %30(wt/wt) PSMA/DMSO çözeltisinden 5 kV, 1 mL/h’de elde edilen nanoliflerin kullanılmasına karar verilmiştir.

3.1.2. %30(wt/wt) PSMA/DMSO nanoliflerinin çapraz bağlanması

Elde edilen nanolifler, birim hacme düşen lif yoğunluğunu arttırarak enzim immobilizasyonun daha kararlı hale getirilmesi maksadıyla çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlama işleminin nasıl yapıldığı metot kısmında detaylı bir şekilde anlatılmıştır. Çapraz bağlı nanoliflerin SEM görüntüsü Şekil 3.8’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.8. %30(wt/wt) PSMA/DMSO çözeltisinden elde edilen nanolifler. (a) çapraz bağlanmamış nanolif (b) çapraz bağlı nanolif

3.1.3. Çapraz bağlı nanoliflere HRP immobilizasyonu

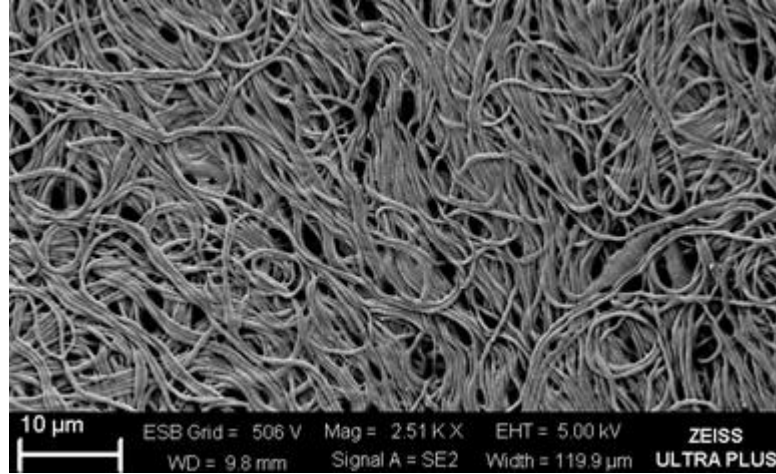
Çapraz bağladığımız nanoliflere enzim immobilizasyonun kararlılığını incelemek maksadıyla öncelikle HRP enzimi immobilize edilmiştir. Enzim immobilizasyonunun yapılaş şekli metot kısmında anlatılmıştır. Enzim immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra nanolifler HRP enziminin substratı olan TMB ile etkileştirilmiştir. Substrat ilavesinden sonra enzim-substrat etkileşmesine özgü renk değişimi gözlenmiştir. Bu durum bize çapraz bağladığımız nanoliflere enzim immobilizasyonunun kararlı bir biçimde gerçekleşebildiğini göstermektedir. Enzim immobilize nanoliflerin substrat ile etkileşimi Şekil 3.9’da gösterilmiştir.



Görsel 3.1. *Enzim immobilize edilmiş nanolifin substrat ile etkileşimi. (a) substrat ile etkileşmemiş nanolif (b) substrat ile etkileşen nanolif*

3.1.4. Kuvars kristal yüzeylerinin AChE immobilize nanolif ile kaplanması

Elde edilen nanoliflerin enzim immobilizasyonuna uygunluğunun tespitinden sonra metot kısmında anlatıldığı şekilde kuvars kristal yüzey AChE immobilize nanolif ile kaplanmıştır. Böylelikle kuvars kristal yüzeyi analit olan paraoksona karşı tanıma tabakasına sahip hale gelmiştir. Nanolif ile kaplanan kuvars elektrot yüzeyinin SEM görüntüsü Şekil 3.10’da gösterildiği gibidir.

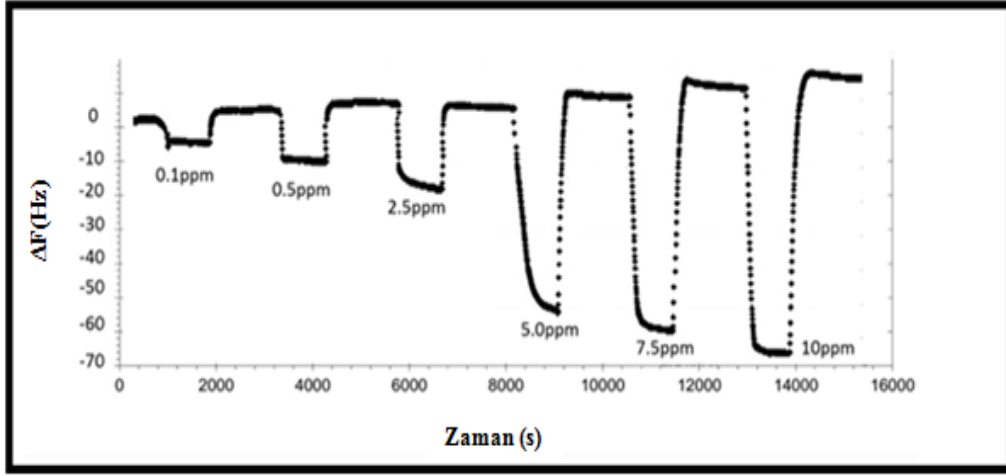


Şekil 3.10. *Nanolif ile kaplı kuvars kristal yüzey*

3.1.5. Tanıyıcı tabaka ile kaplı kuvars kristal elektrotunun analit ile etkileşimi

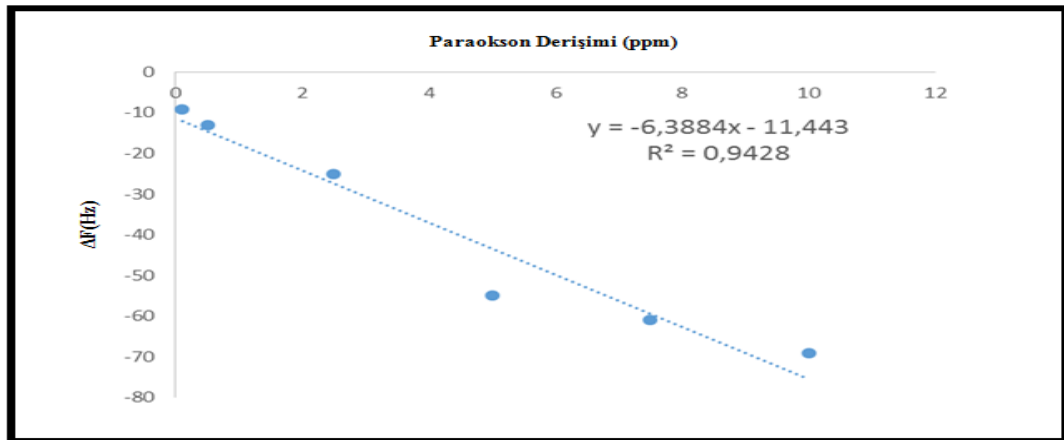
Nanolif ile kaplanmış elektrot QCM cihazına yerleştirilerek farklı derişimlerde paraokson çözeltisi ile etkileşimi incelenmiştir. Bunun için paraoksonun 0,1-10 ppm arasında değişen %50(v/v) metanol içeren sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Analitin

elektrot yüzeyiyle etkileştikten sonraki frekans değişimi ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda elde edilen grafik Şekil 3.11’deki gibidir.



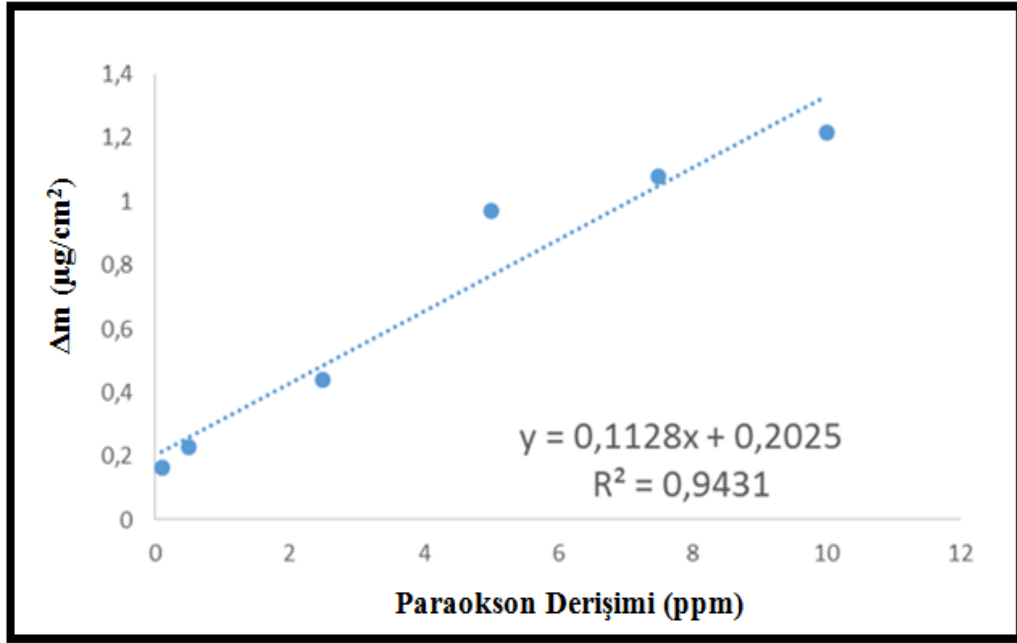
Şekil 3.11. Kuvarts kristal elektrotun paraokson ile etkileşimi sonucundaki frekans değişimi

Elektrot, paraokson ile etkileştiğinde frekans değerinde azalma gözlenmektedir. Analit derişimi arttırıldığında frekanstaki negatif yöndeki değişimde artmaktadır. Bu da göstermektedir ki paraokson ile AChE arasındaki bağlanma sonucunda elektrot yüzeyinde bir kütle artışı meydana gelmektedir. Bu kütle değişimi neticesinde de frekans değişmektedir. Ölçüm sonucu elde edilen veriler kullanılarak derişime karşı frekans değişimi grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 3.12’de verilmiştir.



Şekil 3.12. QCM biyosensörde farklı derişimlerdeki paraokson numunelerine ait kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon doğrusu sonucu elde edilen regresyon katsayısı 0,9428 olarak bulunmuştur. Daha sonra Sauerbrey denkleminde faydalanan elektrot yüzeyine adsorbe olan paraokson miktarı $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değer paraokson derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 3.13’de gösterildiği gibidir.

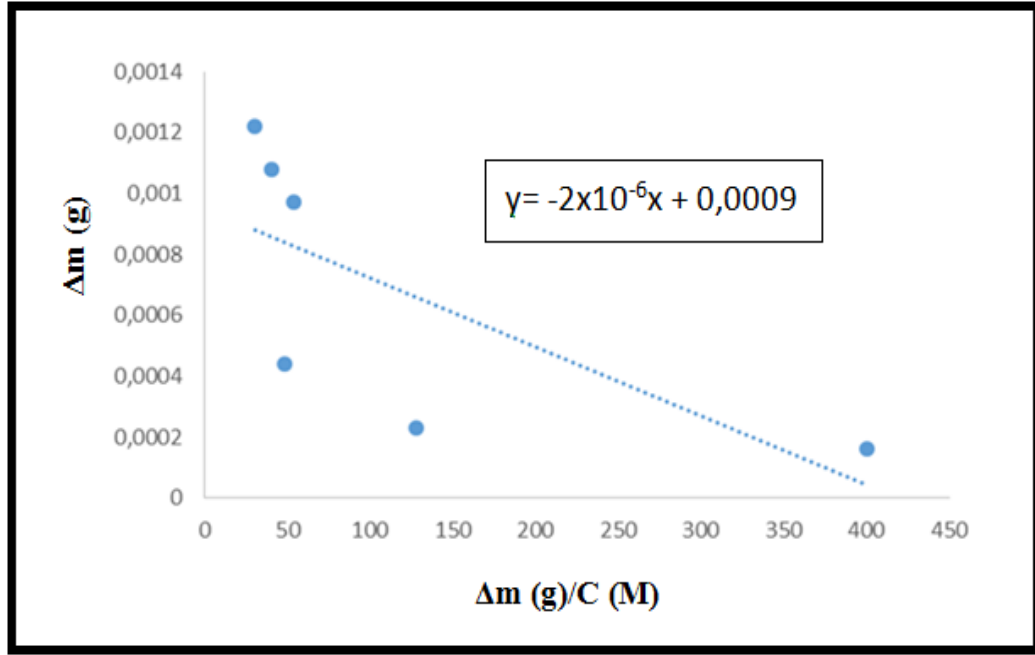


Şekil 3.13. Elektrot yüzeyindeki kütle değişimine karşı analit derişimindeki değişim grafiği

Elektrot yüzeyi ile paraokson arasındaki bağlanma etkileşimini incelemek için Langmuir adsorpsiyon izoterminden yararlanılmıştır. Bu analizi yaparken yararlanılan eşitlik şu şekildedir;

$$\Delta m = -\left(\frac{1}{K_a}\right) \times \left(\frac{\Delta m}{C}\right) + \Delta m_{max} \quad (3.1)$$

Burada K_a Langmuir bağlanma sabitidir. K_a değerini hesaplamak için $\Delta m(g)$ değerine karşı $\Delta m/C$ (g/M) grafiğe geçirilmiştir. Bunun sonucunda elde edilen grafik Şekil 3.14’de gösterilmiştir.



Şekil 3.14. Elektrot yüzeyindeki kütle değişimine karşı analit derişimindeki değişim grafiğı

Grafiğın çizilmesiyle elde edilen denklemden yararlanarak Langmuir bağlanma sabiti hesaplanmıştır. Buna göre langmuir bağlanma sabiti $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

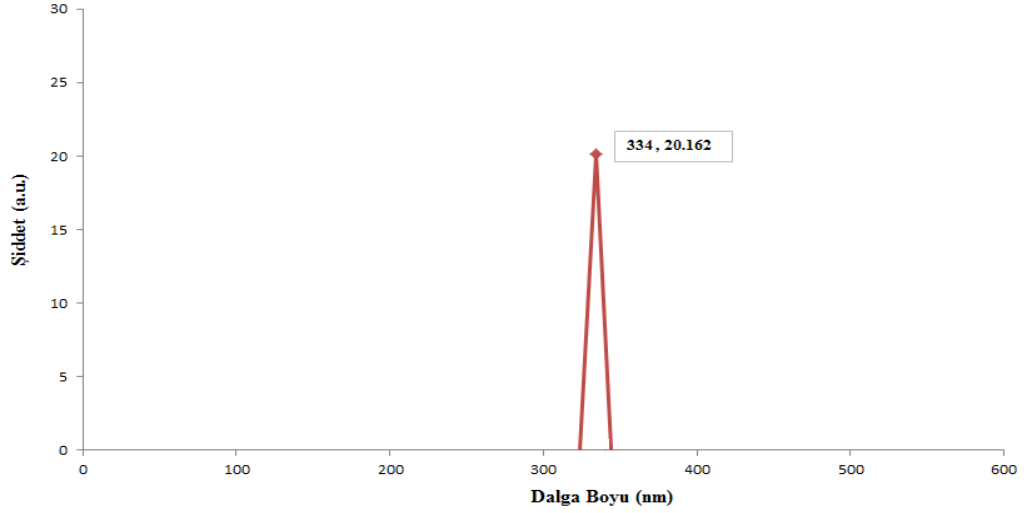
LOD (Gözlenebilme Sınırı) ve LOQ (Tayin Sınırı) hesaplanması maksadıyla blank (kör) çözeltileri hazırlanarak 5 farklı ölçüm alınmıştır. Alınan ölçüm sonuçlarının ortalaması 0,0664, standart sapma ise $4,203 \times 10^{-3}$ olarak hesaplanmıştır. Bulunan standart sapma değerinden yararlanılarak LOD ve LOQ değerlerine geçilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda LOD değeri 0,0126 ppm ($4,57 \times 10^{-8} \text{ molL}^{-1}$), LOQ değeri 0,0418 ppm ($1,52 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) M olarak bulunmuştur.

3.2. Nano AChE Enzimi İle İlgili Elde Edilen Bulgular

3.2.1. Nano AChE enzimi ile numune analizinde çalışılacak dalga boyunun belirlenmesi

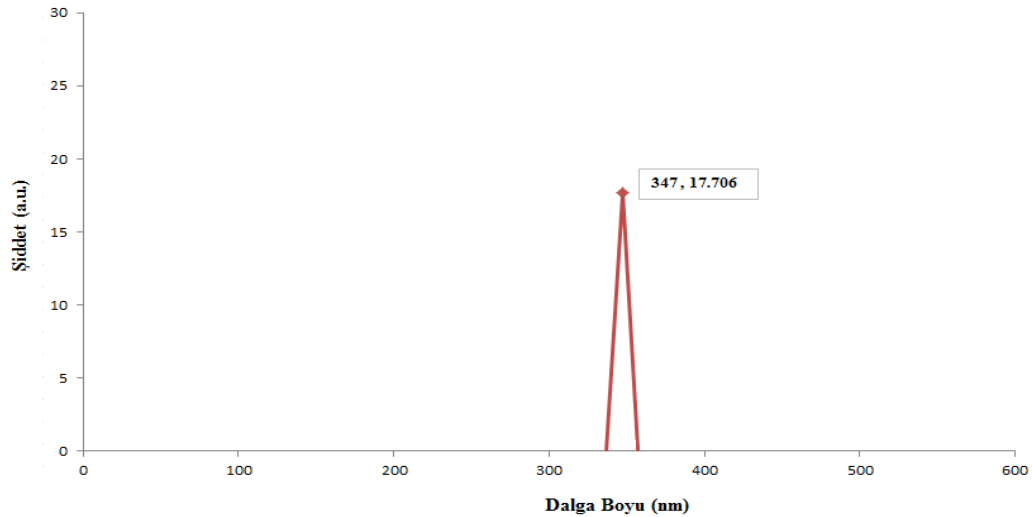
Nano AChE enzimiyle paraokson etkileşimini floresans spektrofotometresi yardımıyla incelemek için öncelikle çalışılacak dalga boyu belirlenmiştir. Bunun için

150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm ile 625 nm arasında değişen dalga boylarında floresans şiddetleri ölçülmüştür. Analiz yapılırken tampon çözelti olarak HEPES (pH=7,4) kullanılmıştır. 150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.15’de gösterildiği gibidir.



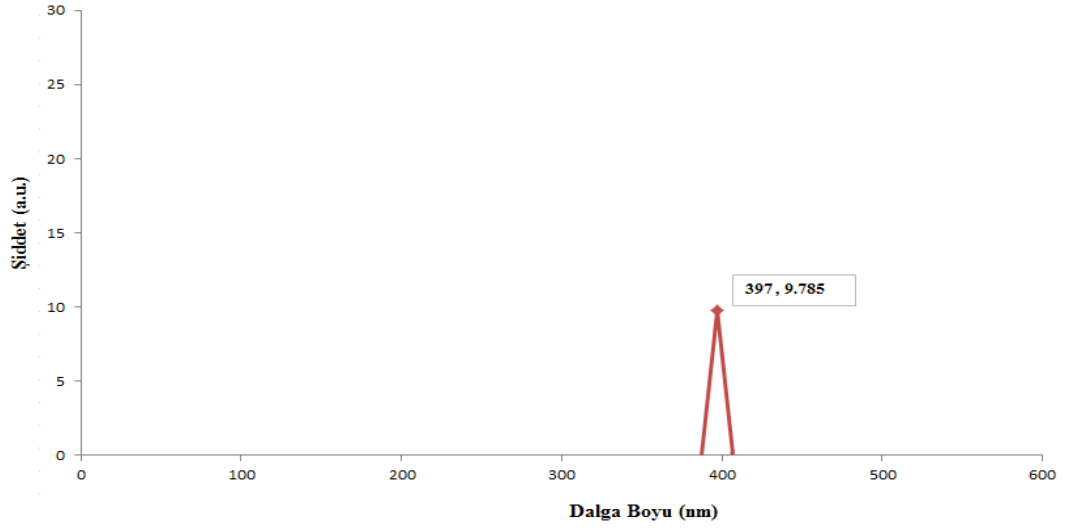
Şekil 3.15. 150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

150 ppm paraokson içeren numunenin 310 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.16’da gösterildiği gibidir.



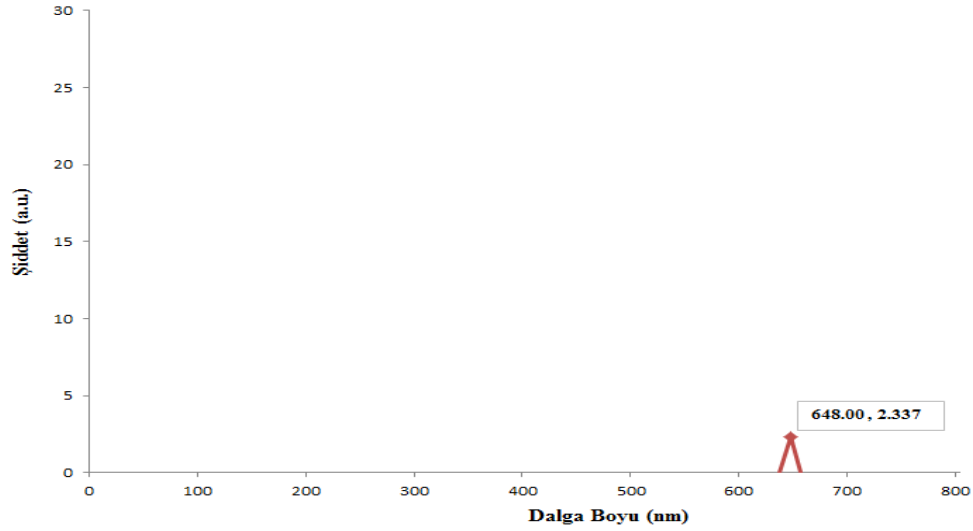
Şekil 3.16. 150 ppm paraokson içeren numunenin 310 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

150 ppm paraokson içeren numunenin 350 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.17’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.17. 150 ppm paraokson içeren numunenin 350 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

150 ppm paraokson içeren numunenin 625 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.18’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.18. 150 ppm paraokson içeren numunenin 625 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde en yüksek floresans şiddetini veren dalga boyunun 300 nm olduğu görülmüştür. Bundan sonraki ölçümlerde çalışılacak dalga boyu olarak 300 nm belirlenmiştir.

3.2.2. Nano AChE enzimi ile numune analizinde çalışılacak pH'nın belirlenmesi

Analizler esnasında çalışılacak pH'nın belirlenmesi amacıyla çeşitli pH değerlerine sahip tampon çözeltiler hazırlanmıştır. 100 µL nano AChE, 150 ppm paraokson çözeltisinden 1 mL alınmış ve hazırlanan tampon çözeltilerle hacim 3 mL'ye seyreltilmiştir

Farklı pH değerlerine sahip olarak hazırlanan her bir numune çözeltisi 300 nm dalga boyuna sahip ışınla uyarılarak floresans şiddetleri ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda elde edilen veriler Tablo 3.1'de verildiği gibidir.

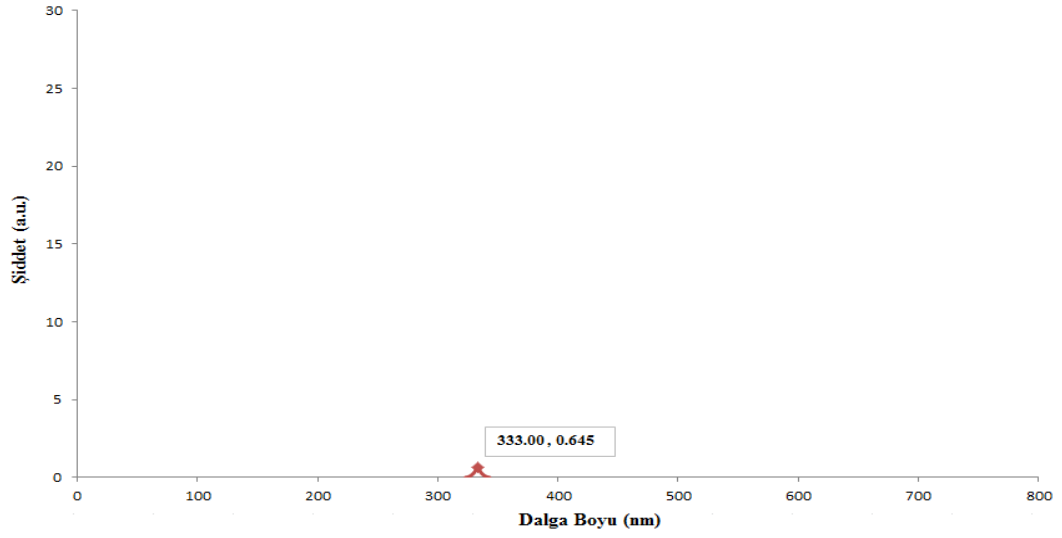
Tablo 3.1. Farklı pH değerlerinde elde edilen floresans şiddetleri

pH	Dalga Boyu (nm)	Analit Derişimi (ppm)	Floresans Şiddeti (a.u.)
2	300	150	14,365
4	300	150	15,784
7,4	300	150	20,162
9	300	150	17,321

Elde edilen ölçüm sonuçları incelendiğinde en yüksek floresans şiddetinin pH 7,4 de elde edildiği görülmüştür. Bundan dolayı bundan sonraki analizlerde HEPES(pH=7,4) tamponu kullanılmasına karar verilmiştir.

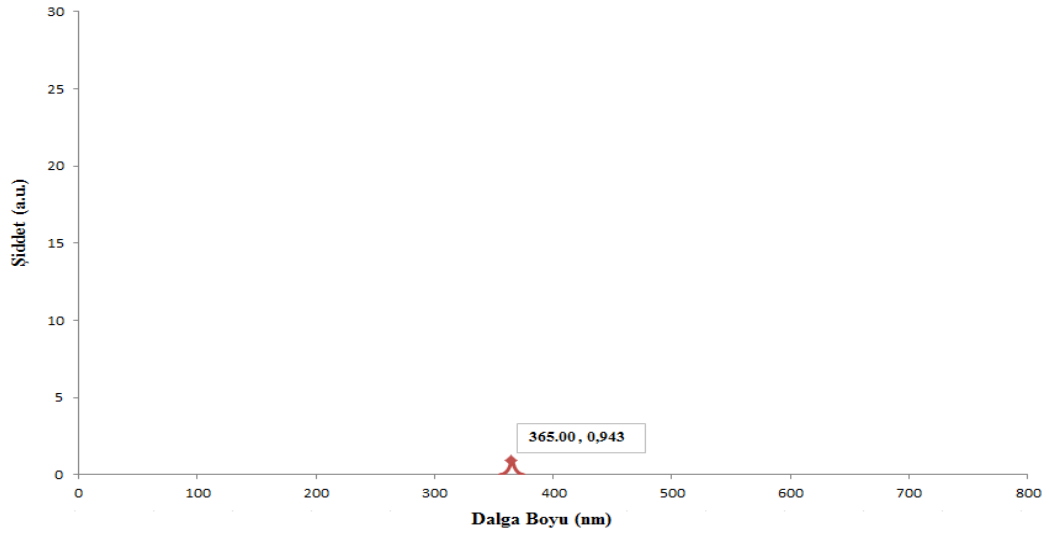
3.2.3. Nano AChE enzimi ile artan derişimdeki paraokson arasındaki etkileşimin incelenmesi

Farklı derişimlerdeki paraokson ile nano AChE etileşimini incelemeden önce çalışılacak pH ve dalga boyunu belirlemiştik. Şimdi ise belirlenen çalışma şartlarında 0,01 ppm ile 200 ppm arasında değişen paraokson numunelerinin floresans şiddetleri ölçülmüştür. 0,01 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.19'da gösterildiği gibidir.



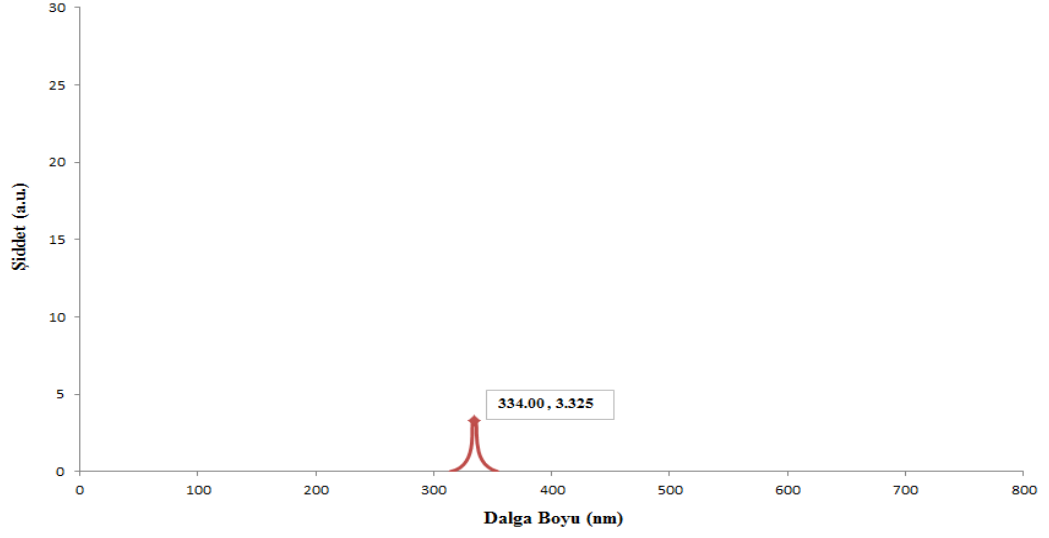
Şekil 3.19. 0,01 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

0,1 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.20’de gösterildiği gibidir.



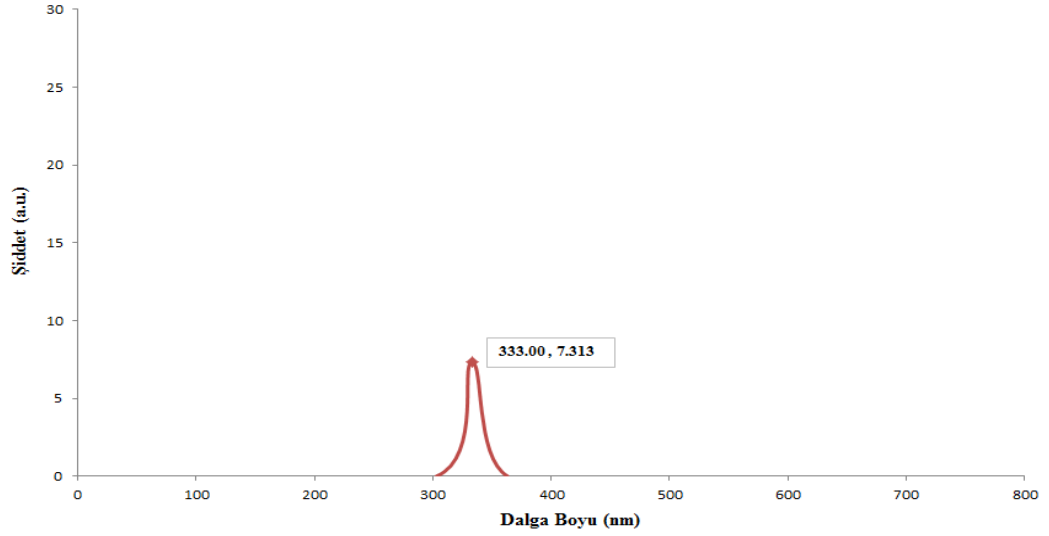
Şekil 3.20. 0,1 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

1 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.21’de gösterildiği gibidir.



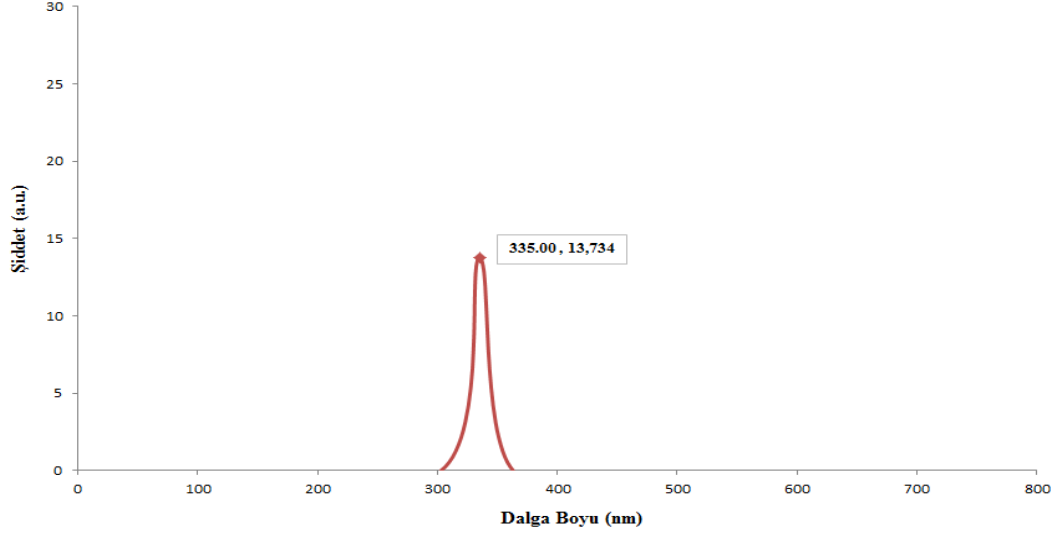
Şekil 3.21. 1 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

10 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.22’de gösterildiği gibidir.



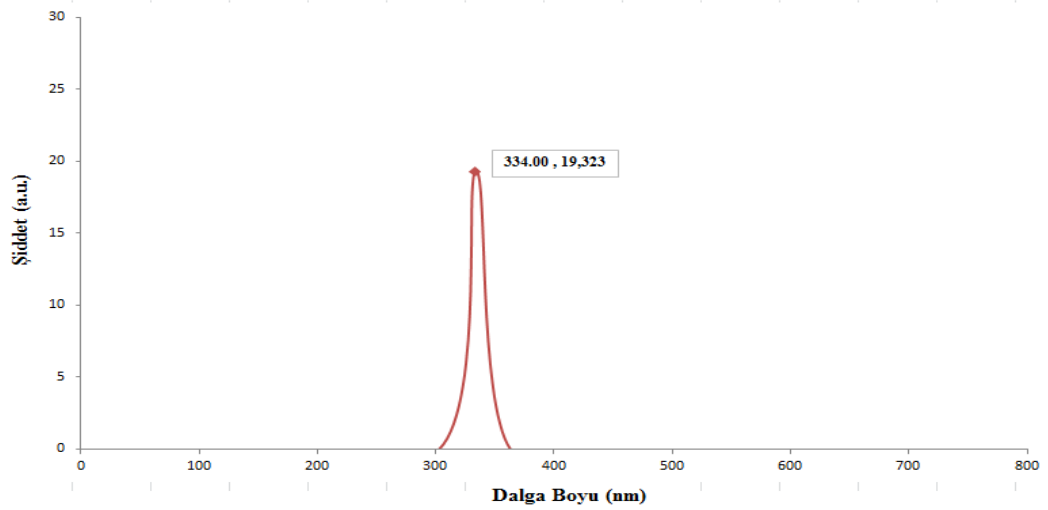
Şekil 3.22. 10 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

50 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.23’de gösterildiği gibidir.



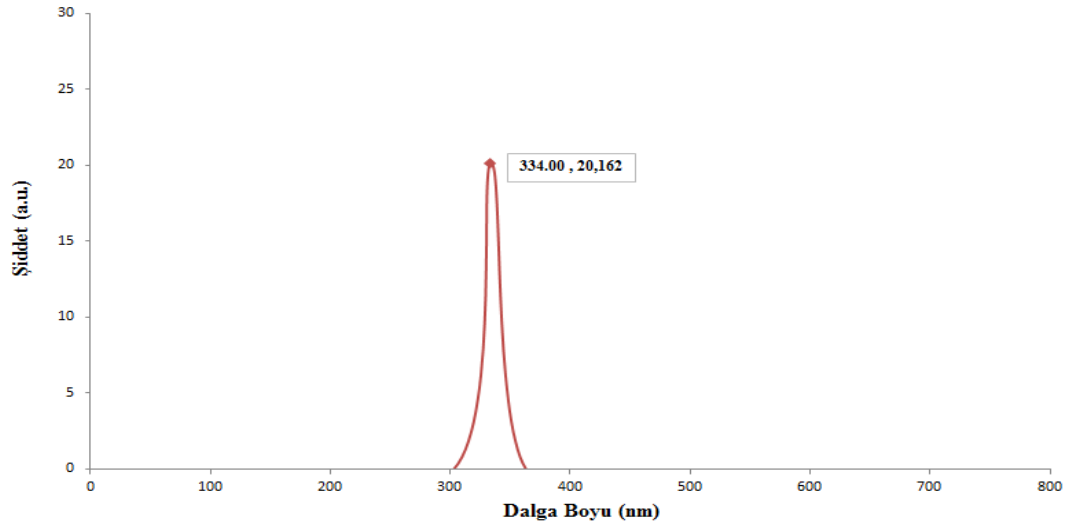
Şekil 3.23. 50 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

100 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.24’de gösterildiği gibidir.



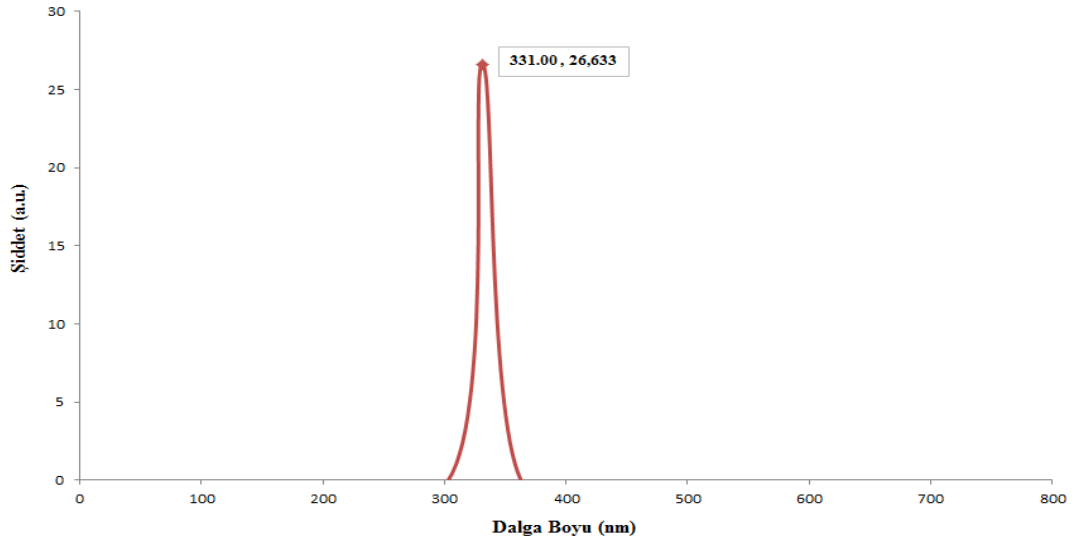
Şekil 3.24. 100 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.25’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.25. 150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

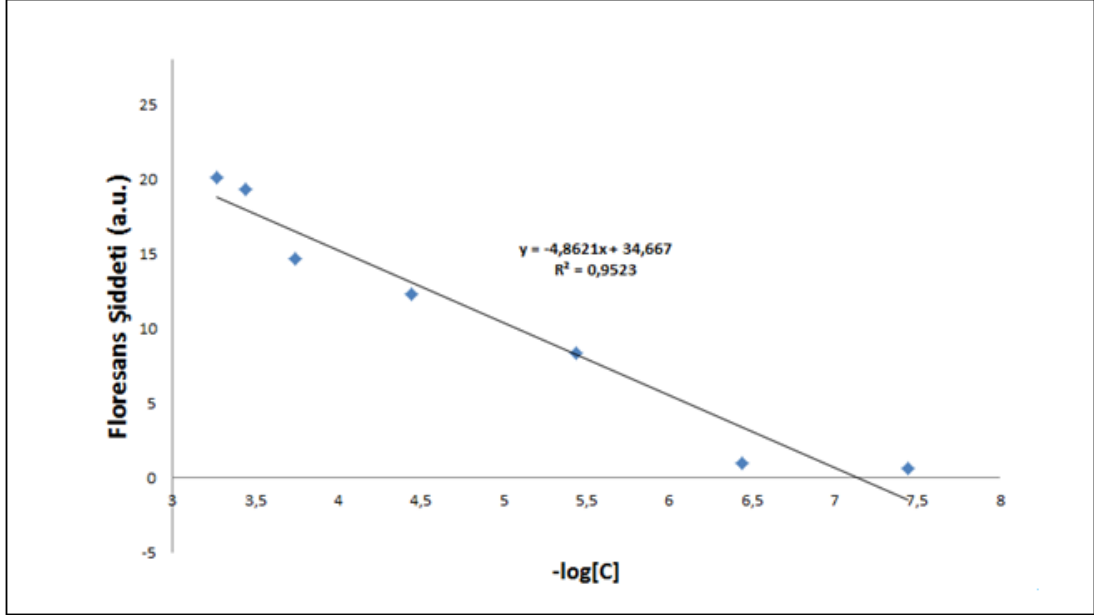
200 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 3.26’da gösterildiği gibidir.



Şekil 3.26. 200 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu

3.2.4. Floresans ölçümleri sonucunda elde edilen paraoksona ait kalibrasyon grafiği

Paraoksonun farklı derişimlerdeki numuneleriyle alınan floresans ölçümleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 3.27’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.27. Farklı derişimlerdeki paraokson numunelerine ait kalibrasyon grafiği

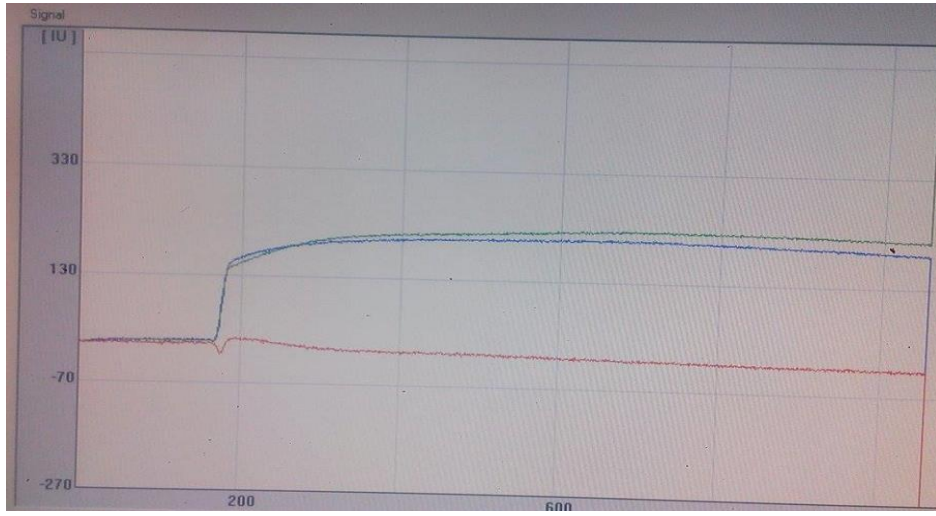
Kalibrasyon doğrusu için paraoksonun çalışılan en yüksek derişimi olan $7,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ değerine kadar floresans spektroskopisinde doğrusala yakın bir ilişki gözlenmiş ve elde edilen regresyon katsayısı 0,9523 olarak bulunmuştur.

LOD (Gözlenebilme Sınırı) ve LOQ (Tayin Sınırı) hesaplanması maksadıyla blank (kör) çözeltileri hazırlanarak 5 farklı ölçüm alınmıştır. Alınan ölçüm sonuçlarının ortalaması 0,73, standart sapma ise 0,212 olarak hesaplanmıştır. Bulunan standart sapma değerinden yararlanılarak LOD ve LOQ değerlerine geçilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda LOD değeri $1,002 \times 10^{-7}$ M, LOQ değeri $2,03 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur.

3.3. Refraktometrik İnterferans Spektroskopisi (RİfS) Temelli Sensör İle İlgili Elde Edilen Bulgular

3.3.1. AChE immobilize CMD çipin spektrumunun alınması

AChE enzimi çip yüzeyine bağlandığında yüzeyin kırılma indisinde değişim olacağından elde edilen spektrumda artış beklenmektedir. Elde edilecek artış immobilizasyon işleminin gerçekleştiğini gösterecektir. Bu nedenle AChE enziminin immobilizasyonu sırasında CMD çipe ait spektrum alınmıştır. Elde edilen spektrum Şekil 3.28’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.28. AChE enzim immobilizasyonu sonucu elde edilen spektrum

Elde edilen spektrumdaki yükseliş, çip yüzeyine enzim immobilizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir.

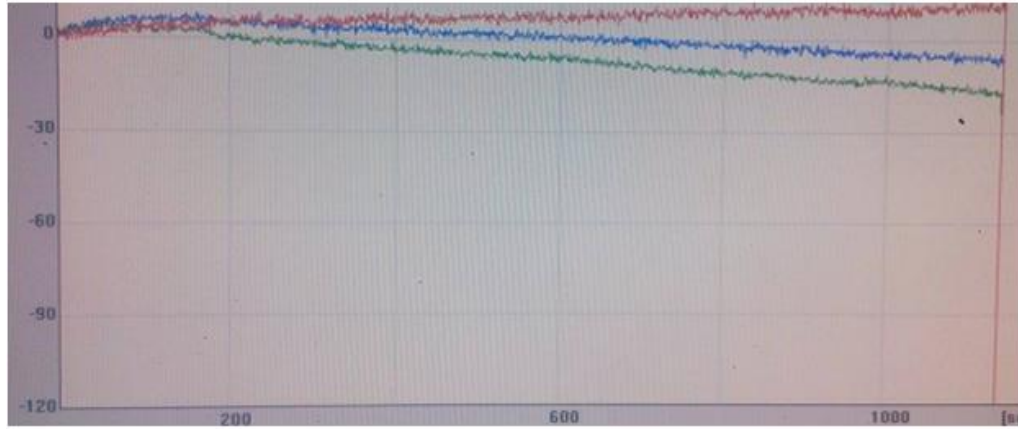
3.3.2. Farklı derişimlerdeki paraokson çözeltilerinin spektrumlarının alınması

Hazırlanan AChE immobilize CMD çip yüzeyine farklı derişimler de paraokson çözeltileri uygulanmıştır. Analit olarak kullanılan paraokson çözeltileri Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Hazırlanan paraokson çözeltileri

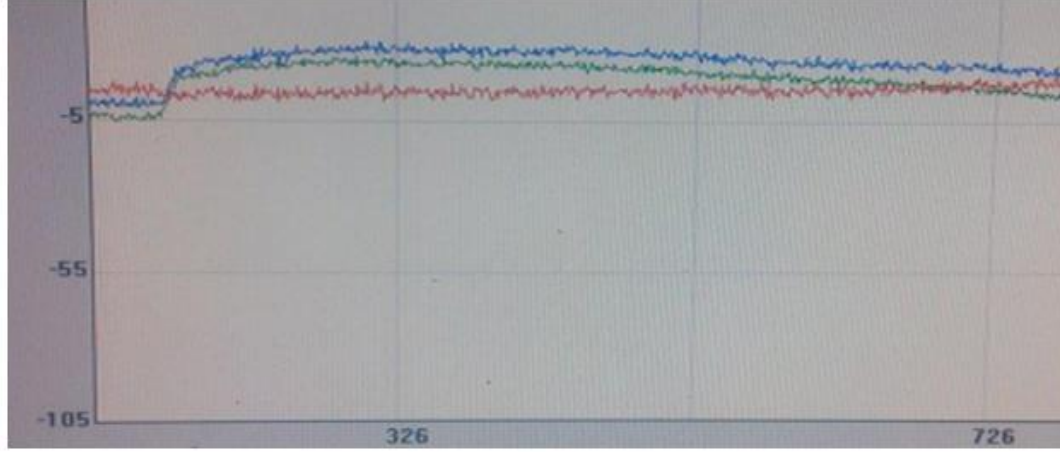
ppm	Molarite
0,01	$3,6 \times 10^{-8}$
0,1	$3,6 \times 10^{-7}$
1	$3,6 \times 10^{-6}$
10	$3,6 \times 10^{-5}$
50	$1,8 \times 10^{-4}$
100	$3,6 \times 10^{-4}$
150	$5,4 \times 10^{-4}$

0,01 ppm paraokson çözeltisi çip yüzeyine uygulandıktan sonra elde edilen spektrum Şekil 3.29’da verilmiştir.



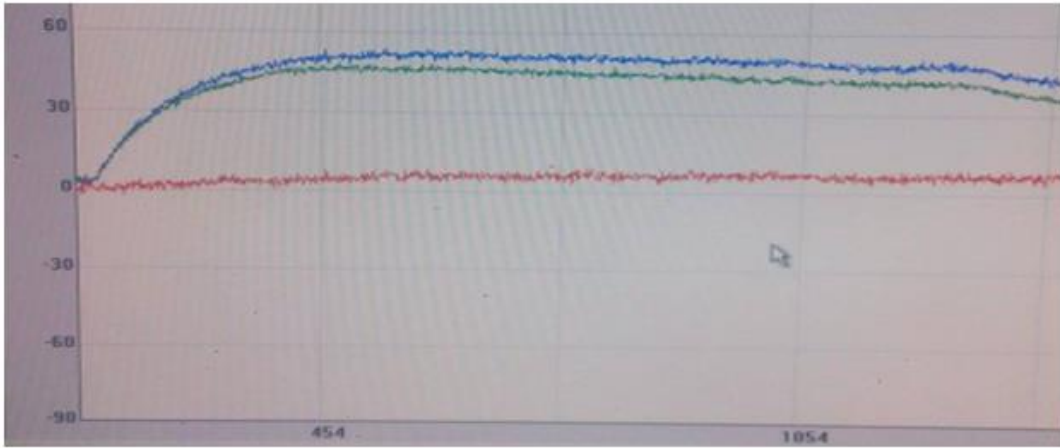
Şekil 3.29. 0,01 ppm paraokson çözeltisi spektrumu

0,1 ppm paraokson çözeltisi çip yüzeyine uygulandıktan sonra elde edilen spektrum Şekil 3.30'da verilmiştir.



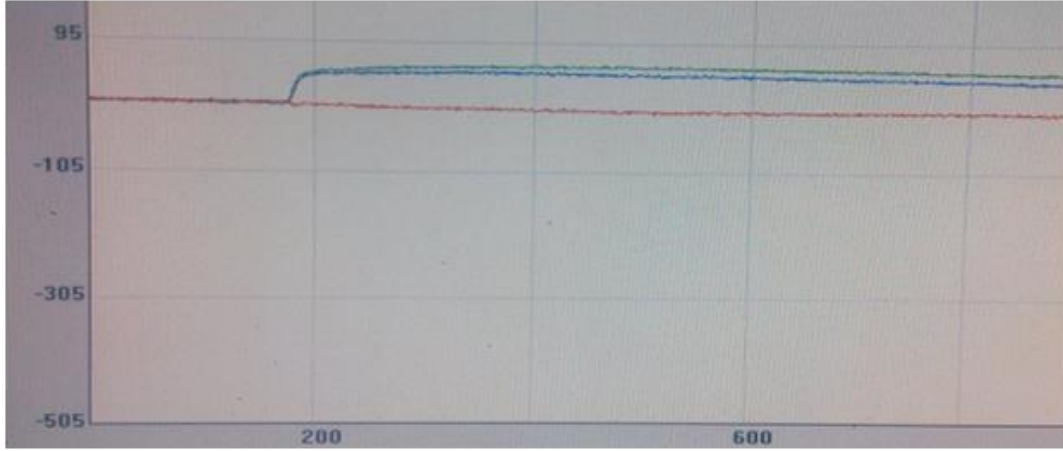
Şekil 3.30. 0,1 ppm paraokson çözeltisi spektrumu

1 ppm paraokson çözeltisi çip yüzeyine uygulandıktan sonra elde edilen spektrum Şekil 3.31'de verilmiştir.



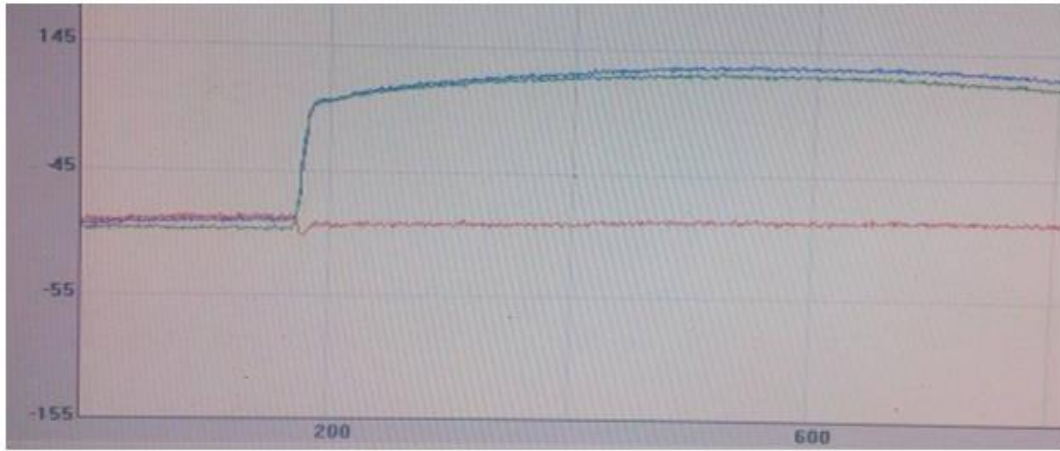
Şekil 3.31. 1 ppm paraokson çözeltisi spektrumu

10 ppm paraokson çözeltisi çip yüzeyine uygulandıktan sonra elde edilen spektrum Şekil 3.32’de verilmiştir.



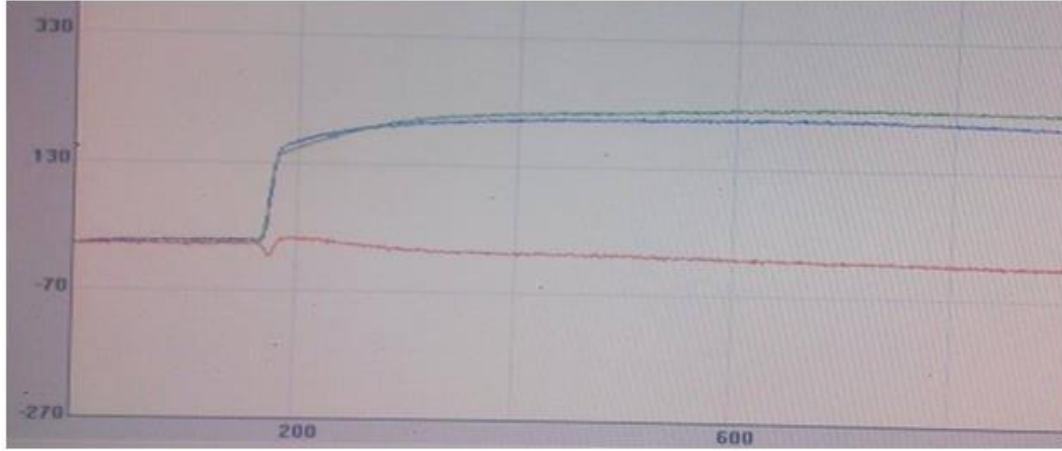
Şekil 3.32. 10 ppm paraokson çözeltisi spektrumu

50 ppm paraokson çözeltisi çip yüzeyine uygulandıktan sonra elde edilen spektrum Şekil 3.33’de verilmiştir.



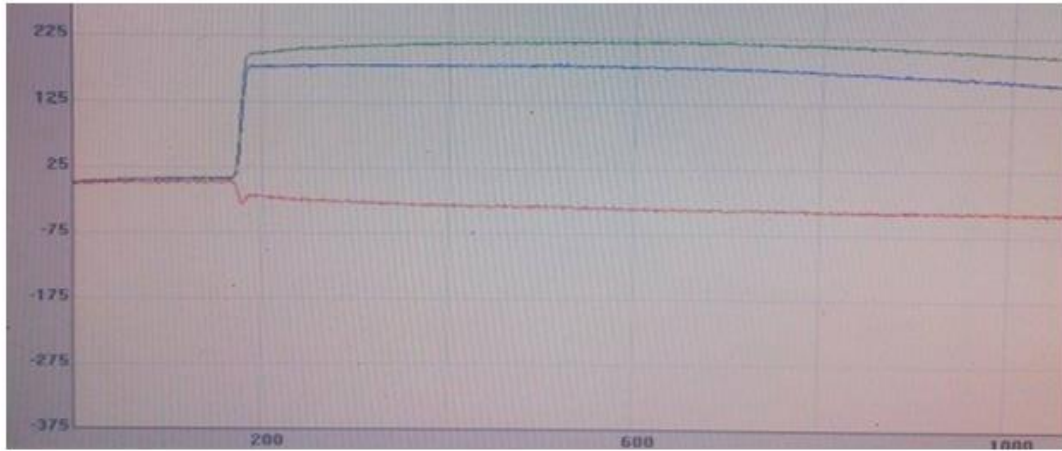
Şekil 3.33. 50 ppm paraokson çözeltisi spektrumu

100 ppm paraokson çözeltisi çip yüzeyine uygulandıktan sonra elde edilen spektrum Şekil 3.34’de verilmiştir.



Şekil 3.34. 100 ppm paraokson çözeltisi spektrumu

150 ppm paraokson çözeltisi çip yüzeyine uygulandıktan sonra elde edilen spektrum Şekil 3.35’de verilmiştir.



Şekil 3.35 150 ppm paraokson çözeltisi spektrumu

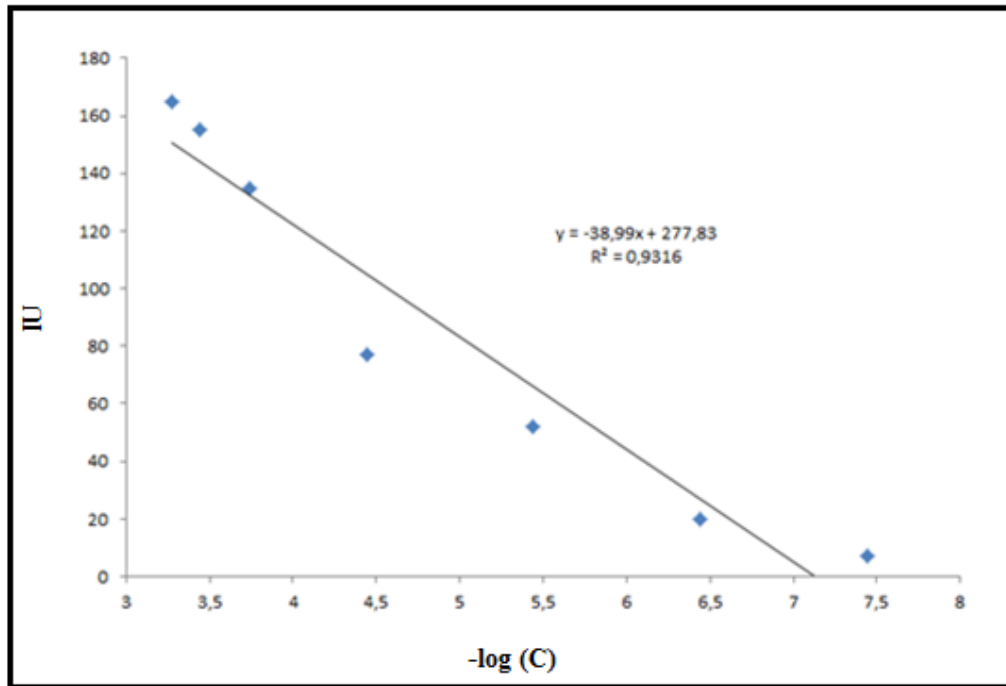
3.3.3. RİFS ölçümleri sonucunda paraoksone ait kalibrasyon grafiğinin çizilmesi

Paraoksone ait farklı derişimlerdeki numuneler için alınan ölçüm sonuçları aşağıdaki Tablo 3.3’de verildiğı gibidir.

Tablo 3.3. Paraokson çözeltileri için elde edilen ölçüm sonuçları

ppm	Molarite (C)	-log (C)	IU
0,01	$3,6 \times 10^{-8}$	7,44	7
0,1	$3,6 \times 10^{-7}$	6,44	20
1	$3,6 \times 10^{-6}$	5,44	52
10	$3,6 \times 10^{-5}$	4,44	77
50	$1,8 \times 10^{-4}$	3,74	135
100	$3,6 \times 10^{-4}$	3,44	155
150	$5,4 \times 10^{-4}$	3,27	165

Bu ölçüm sonuçlarına göre çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 3.36’da verilmiştir.



Şekil 3.36. Refraktometrik İnterferans Spektroskopisinde farklı derişimlerdeki paraokson numunelerine ait kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon doğrusu için paraoksonun çalışılan en yüksek derişimi olan $5,4 \times 10^{-4}$ mol/L değerine kadar refraktometrik interferans spektroskopisinde doğrusala yakın bir ilişki gözlenmiş ve elde edilen regresyon katsayısı 0,9316 olarak bulunmuştur.

LOD (Gözlenebilme Sınırı) ve LOQ (Tayin Sınırı) hesaplanması maksadıyla blank (kör) çözeltileri hazırlanarak 5 farklı ölçüm alınmıştır. Alınan ölçüm sonuçlarının

ortalaması 7, standart sapma ise 1,58 olarak hesaplanmıştır. Bulunan standart sapma değerinden yararlanılarak LOD ve LOQ değerlerine geçilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda LOD değeri $9,9 \times 10^{-8}$ M, LOQ değeri $1,9 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur.

3.4. Potansiyometrik Sensör İle İlgili Elde Edilen Bulgular

3.4.1. Potansiyometrik sensör için şartlandırma yapılması

Analizlere başlamadan önce ne kadar süre sonunda ölçümün tamamlandığını, rejenerasyon süresinin ve elektrolitin dengeye gelme zamanını tespit etmek maksadıyla şartlandırma işlemi uygulanmıştır. Bunun için elektrot; 0,1 ppm paraokson, 0,1 M KOH ve 0,1 M KCl çözeltileri içerisine daldırılmış ve potansiyelin stabil hale geldiği süreler belirlenmiştir. Bunun için 60 dakikalık süre içerisinde 5 dakikalık aralıklarla ölçümler alınmıştır. Ölçülen değerler Tablo 3.4 , Tablo 3.5 ve Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.4. 0,1 ppm Paraokson çözeltisi için şartlandırma verileri

Zaman (dak.)	Potansiyel (mV)
0	56,2
5	54,8
10	54,1
15	53,4
20	52,2
25	47,5
30	45,3
35	45,1
40	12,4
45	12,5
50	12,4
55	12,6
60	12,4

Tablo 3.5. 0,1M KOH çözeltisi için şartlandırma verileri

Zaman (dak.)	Potansiyel (mV)
0	20,7
5	22,8
10	23,7
15	24,2
20	24,9
25	26,9
30	27,7
35	28,3
40	29,0
45	30,0
50	29,9
55	29,9
60	30,0

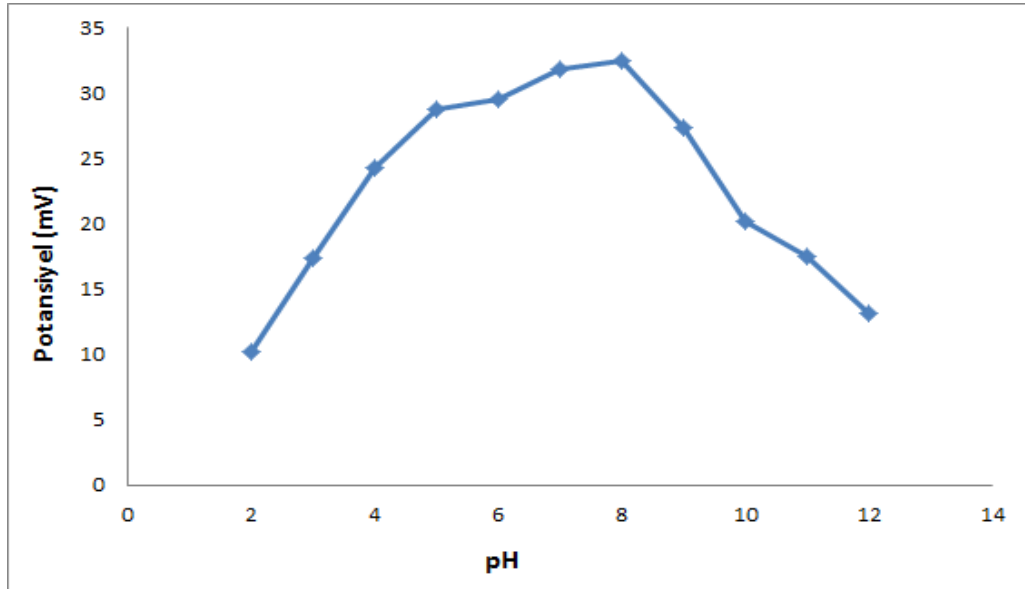
Tablo 3.6. 0,1M KCl çözeltisi için şartlandırma verileri

Zaman (dak.)	Potansiyel (mV)
0	34,1
5	32,3
10	31,2
15	30,4
20	29,0
25	28,1
30	27,6
35	27,9
40	27,8
45	27,7
50	27,8
55	27,7
60	27,6

Tablo 3.4, Tablo 3.5 ve Tablo 3.6’da verilen ölçüm sonuçlarına göre şartlandırma süreleri; paraokson için 40 dakika, KOH için 45 dakika, KCl için ise 30 dakika olarak bulunmuştur. Bu aşamadan sonra yapılan analizlerde bu süreler dikkate alınarak ölçümler alınmıştır.

3.4.2. Çalışma pH’sının belirlenmesi

Hazırlanan seçici elektrotun çalışma pH’sını belirlemek için 10 ppm paraokson içeren pH 2–12 arası fosfat tamponu çözeltileri hazırlanmıştır. pH 2-12 arasında sensörün potansiyometrik davranışı Şekil 3.37’de görülmektedir.



Şekil 3.37. Hazırlanan elektrotun potansiyel (mV)-pH grafiği (10 ppm paraokson içeren fosfat tamponu çözeltileri)

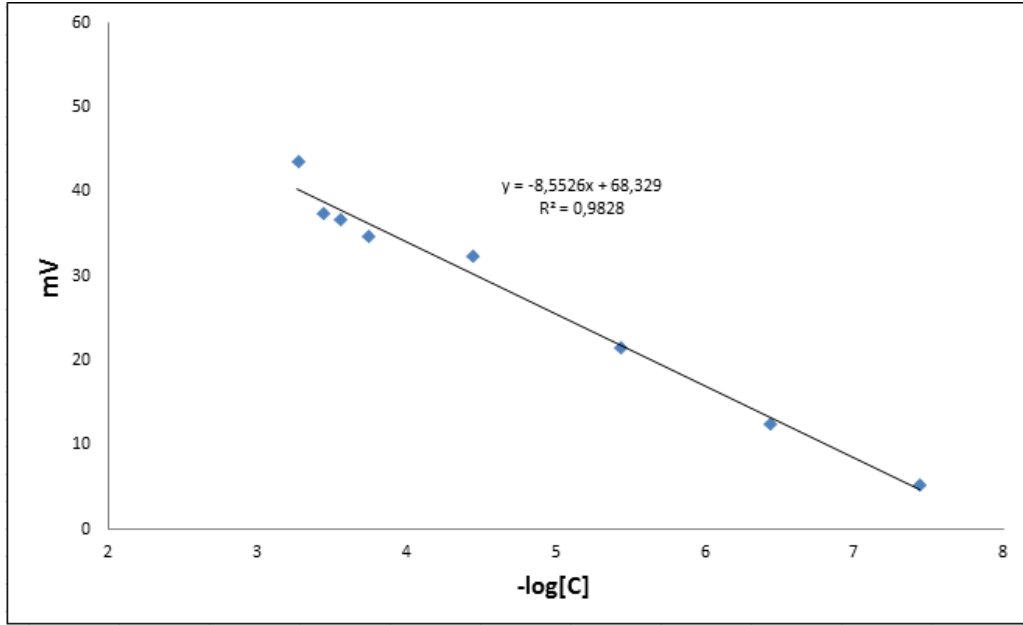
Şekil 3.37’de görüldüğü üzere 10 ppm paraokson çözeltisi için okunan en yüksek potansiyel değeri pH 7-8 aralığında bulunmuştur. Bundan dolayı yapılan ölçümlerde HEPES tamponu (pH: 7,4) kullanılmıştır.

3.4.3. Potansiyometrik ölçümler sonucunda paraoksona ait kalibrasyon grafiğinin çizilmesi

Hazırlanan potansiyometrik sensör ile 0,01-200 ppm arasında değişen derişimlerdeki paraokson numuneleri için ölçümler alınmıştır. Ölçüm alırken hazırlanan elektrot numunenin bulunduğu kaba daldırılmış ve şartlanma süresi olarak belirlenen 40 dakika boyunca beklenmiştir. 40 dakikanın sonunda cihazda okunan potansiyel değeri not edilmiştir. Numune analizinden sonra rejenerasyon için elektrot KOH çözeltisi içinde 45 dakika bekletilmiştir. Son olarak elektrolit dengesinin sağlanması amacıyla elektrot KCl çözeltisinde 30 dakika bekletilmiştir. Bu işlemler uygulanarak alınan ölçüm sonuçları Tablo 3.7’de ve çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 3.38’de verilmiştir.

Tablo 3.7. Farklı derişimlerde paraokson içeren numunelerin potansiyel ölçümleri

ppm	C (Molarite)	mV
0,01	$3,6 \times 10^{-8}$	5,3
0,1	$3,6 \times 10^{-7}$	12,4
1	$3,6 \times 10^{-6}$	21,5
10	$3,6 \times 10^{-5}$	32,3
50	$1,8 \times 10^{-4}$	34,6
75	$2,7 \times 10^{-4}$	36,7
100	$3,6 \times 10^{-4}$	37,3
150	$5,4 \times 10^{-4}$	43,5
200	$7,2 \times 10^{-4}$	47,2



Şekil 3.38 Potansiyometrik sensörde farklı derişimlerdeki paraokson numunelerine ait kalibrasyon grafiğı

Kalibrasyon doğrusu için paraoksonun çalışılan en yüksek derişimi olan $7,2 \times 10^{-4}$ mol/L değerine kadar potansiyometrik sensörde doğrusal bir ilişki gözlenmiş ve elde edilen regresyon katsayısı 0,9828 olarak bulunmuştur.

LOD (Gözlenebilme Sınırı) ve LOQ (Tayin Sınırı) hesaplanması maksadıyla blank (kör) çözeltileri hazırlanarak 5 farklı ölçüm alınmıştır. Alınan ölçüm sonuçlarının ortalaması 0,92, standart sapma ise 0,286 olarak hesaplanmıştır. Bulunan standart sapma değerinden yararlanılarak LOD ve LOQ değerlerine geçilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda LOD değeri $2,19 \times 10^{-8}$ M, LOQ değeri $1,22 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur.

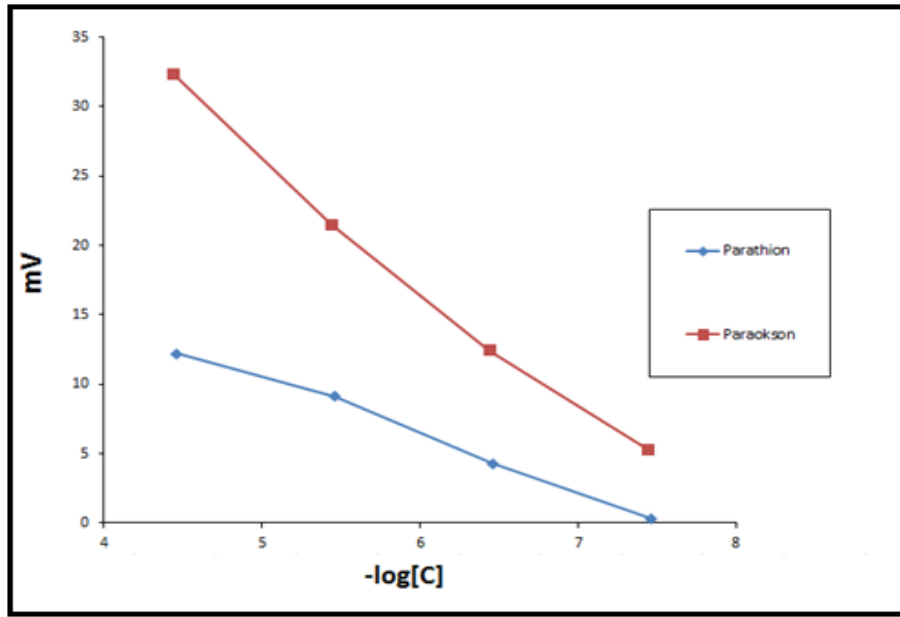
3.4.4. Potansiyometrik sensörün seçiciliğinin belirlenmesi

Potansiyometrik sensörün seçiciliğinin bulunması için analit olarak parathion kullanılmış ve farklı derişimleri için ölçümler alınmıştır. Parathion molekülünün molekül yapısı paraoksona çok benzediğı için seçicilik tespitinde kullanılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen veriler Tablo 3.8’de gösterilmiştir.

Tablo 3.8. *Farklı derişimlerde parathion içeren numunelerin potansiyel ölçümleri*

ppm	C (Molarite)	mV
0,01	$3,43 \times 10^{-8}$	-1,5
0,1	$3,43 \times 10^{-7}$	4,3
1	$3,43 \times 10^{-6}$	9,1
10	$3,43 \times 10^{-5}$	12,2

Paraoksonun ve parathionun aynı derişimlerine ait ölçüm sonuçları kıyaslanması maksadıyla grafiğe geçirilerek Şekil 3.39’da verilmiştir.



Şekil 3.39. *Paraokson ve Parathion moleküllerinin Potansiyel (mV) -log C (M) grafiği*

Şekil 3.39 incelendiğinde paraokson için yapılan ölçümlerde elde edilen potansiyel değerlerinin parathiona kıyasla çok yüksek olduğu görülmüştür. Özellikle düşük derişimlere inildiğinde bu fark çok daha net ortaya konmuştur. 0,01 ppm için paraoksonun ölçülen potansiyel değeri 5,3 mV iken, parathion için ölçülen potansiyel eksi değerlere inmiştir. Bu veriler ışığında seçici elektrotun paraoksona duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

3.4.5. Girişim etkisinin incelenmesi

Seçiciliğin ölçülmesinden sonra geliştirilen paraokson seçici potansiyometrik sensörün girişim etkisi altındaki performansı incelenmiştir. Bunun için paraokson ile

parathionun farklı oranlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler Tablo 3.9’da belirtildiği gibidir

Tablo 3.9. *Girişim etkisini incelemek için hazırlanan çözeltiler*

Paraokson		Parathion		Oran
ppm	mL	ppm	mL	
2	1	2	1	1:1
2	1	10	1	1:5
2	1	20	1	1:10

Yapılan ölçümler sonucunda 1:1 oranı için 21,4 mV, 1:5 oranı için 20,8 mV ve 1:10 oranı için 20,3 mV değerleri okunmuştur. Bu veriler ışığında %girişim etkisi; 1:1 oranı için %0,46, 1:5 oranı için %3,25 ve 1:10 oranı içinse %5,58 olarak hesaplanmıştır.

Buradan yola çıkarak paraoksonun kimyasal yapısına benzer moleküller içeren analiz ortamının girişim etkisinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu sonucuna varılabilir.

3.4.6. Paraokson baskılanmamış polimerle (NIP) ölçüm alınarak MIP ile kıyaslanması

Paraokson seçici elektrot geliştirirken MIP yöntemiyle paraokson baskılanmış polimerler elde etmiş ve burada elektrotta tanıma tabakası olarak kullanmıştık. Hazırlanan tanıma tabakasının analite olan duyarlılığının ortaya konması maksadıyla daha sonra NIP yöntemiyle elde edilen polimer potansiyometrik sensör de tanıma tabakası olarak kullanıldı. NIP yöntemiyle yapılan ölçümler sonucu elde edilen veriler Tablo 3.10’ da gösterildiği gibidir.

Tablo 3.10. *NIP ile hazırlanan tanıma tabakasıyla alınan ölçümler*

ppm	C (Molarite)	mV
0,01	$3,6 \times 10^{-8}$	-1,9
0,1	$3,6 \times 10^{-7}$	-1,6
1	$3,6 \times 10^{-6}$	-1,7
10	$3,6 \times 10^{-5}$	-1,1
50	$1,8 \times 10^{-4}$	-1,5
75	$2,7 \times 10^{-4}$	-1,7
100	$3,6 \times 10^{-4}$	-1,5

150	$5,4 \times 10^{-4}$	-1,6
200	$7,2 \times 10^{-4}$	-1,4

Elde edilen sonuçlar göstermekteki MIP yöntemiyle elde edilen paraokson baskılı polimerler elektrot yüzeyinde hedef molekül olan paraoksona seçicilik göstermektedir. Molekül baskılama prosedürü esnasında paraokson kullanmayarak elde edilen polimerlere ölçüm sırasında paraokson molekülleri bağlanamamış dolayısıyla elde edilen potansiyel değerlerinde değişim olmamıştır.

3. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kimyasal savaş ajanlarının tespitine yönelik sensörler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Organofosforlu bileşik olarak paraokson kullanılmıştır. Paraokson molekülü asetilkolinesteraz enzimini geri dönüşsüz olarak inhibe etmektedir. Bu yönüyle sinir ajanlarına benzemesinden dolayı tercih edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda paraokson tayinine yönelik farklı yaklaşımlara sahip dört yöntem geliştirilmiştir.

İlk olarak paraokson tayinine yönelik QCM biyosensör geliştirilmiştir. Bu amaçla Poli(stiren-alt-maleik anhidrid) polimeri nanolif elde etmek amacıyla sentezlenmiştir. Elektro-çekme işleminde kullanılmak üzere polimer çözeltileri hazırlanmıştır. Çözücü olarak DMSO, DMF kullanılmış ve bu çözücüler ile polimerin %30(wt/wt)'luk çözeltileri hazırlanmıştır. Elektro-çekme işleminin çalışma parametrelerini belirlemek maksadıyla 5-7 kV potansiyel ve 1-2 mL/h akış hızı aralığında tarama yapılmıştır. Taramalar sonucunda elde edilen nanoliflerin SEM görüntülerine bakılmıştır. %30(wt/wt) PSMA/DMSO çözeltisi için 5 kV potansiyel, 1,0 mL/h akış hızı değerinde nanolif elde edildiği diğer şartlarda ise boncuklu yapıların oluştuğu görülmüştür. %30(wt/wt) PSMA/DMF çözeltisi için 5 kV potansiyel ve 1,5 mL/h akış hızı değerinde nanolif elde edildiği diğer şartlarda ise boncuklu yapıların oluştuğu görülmüştür. Elde edilen nanolifler, lif yoğunluğu ve kalınlığı açısından değerlendirildiğinde en uygun nanolifin elde edildiği çözeltinin %30(wt/wt) PSMA/DMSO, en uygun çalışma şartlarının 5 kV potansiyel ve 1 mL/h akış hızı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen nanolifin enzim immobilizasyonuna uygunluğunu anlamak maksadıyla ilk olarak HRP enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu maksatla elde edilen nanolif 1,4-fenildiamin ile çapraz bağlanmış, çapraz bağlı nanolifler glutaraldehit ile immobilizasyon için aktif hale getirilmiş ve son olarak HRP enzimi immobilize edilmiştir. Enzim immobilizasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol için, enzim immobilize nanolif, HRP'nin substratı olan TMB ile etkileştirilmiş ve bu etkileşime özgü renk değişimi gözlenmiştir. Nanolifin immobilizasyona uygunluğunun tespitinden sonra kuvars elektrotun AChE enzimi immobilize edilmiş nanolif ile kaplanma basamağına geçilmiştir. Bu amaçla ilk olarak kuvars elektrot yüzeyi 4-aminotiyofenol ile fonksiyonelize edilmiştir. %30'luk(wt/wt) PSMA/DMSO çözeltisi, çapraz bağlayıcı olarak (MATyr)₂ rutenyum(MAT-Ru(bipyr)₂-MAT) ve enzimimiz asetilkolinesteraz belirli şartlarda karıştırılıp şıngaya alınarak elektro çekme sistemine

yerleştirilmiştir. Toplayıcı levha kısmına ise fonksiyonelize edilen kuvars elektrot konulmuş ve elektrot yüzeyi enzim immobilize edilmiş nanolif ile kaplanmıştır. Elektrot yüzeyine kaplanan nanolif SEM görüntüsüne bakılarak incelenmiş ve çapraz bağlı nanoliflerin olduğu gözlemlenmiştir. Tanıyıcı tabaka ile kaplanan kuvars elektrot, paraoksonun 0,1-10 ppm arasında değişen %50(v/v) metanol içeren sulu çözeltileriyle sırayla etkileştirilmiştir. Elektrot, paraokson ile etkileştiğinde frekans değerinde azalma gözlenmiştir. Analit derişimi arttırıldığında frekanstaki negatif yöndeki değişimde artmaktadır. Bu da göstermektedir ki paraokson ile asetilkolinesteraz arasındaki bağlanma sonucunda elektrot yüzeyinde bir kütle artışı meydana gelmektedir. Bu kütle değişimi neticesinde de frekans değişmektedir. Elde edilen veriler grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Kalibrasyon grafiğine ait regrasyon katsayısı 0,9428 olarak hesaplanmıştır. LOD (Gözlenebilme Sınırı) ve LOQ (Tayin Sınırı) hesaplanması maksadıyla blank (kör) çözeltileri hazırlanarak 5 farklı ölçüm alınmıştır. Hesaplamalar sonucunda LOD değeri $4,57 \times 10^{-8}$, LOQ değeri $1,52 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bize göstermektedir ki geliştirilen yöntemle çok düşük miktarlardaki paraokson numunelerinin analizi yapılabilmektedir. Daha sonra Sauerbrey denkleminde faydalanarak elektrot yüzeyine adsorbe olan paraokson miktarı $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değer paraokson derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğe ait regrasyon katsayısı 0,9431 olarak hesaplanmıştır. Elektrot yüzeyi ile paraokson arasındaki bağlanma etkileşimini incelemek için langmuir adsorpsiyon denkleminde yararlanılmıştır. Bağlanma sabiti K_a 'nın hesaplanması maksadıyla $\Delta m(g)$ değerine karşı $\Delta m/C$ (g/M) grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafikten K_a bağlanma sabiti $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

İkinci yöntem olarak; rutenyum tabanlı aminoasit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama (ANADOLUCA) yöntemine göre sentezlenen nano enzim sistemi kullanılmıştır. Nano AChE enzimi elde edilirken mikroemülsiyon polimerizasyon tekniği kullanılmıştır. AChE, $(\text{MATyr})_2\text{Ru}(\text{bipy})_2$ ile etkileştirilerek mikroemülsiyon polimerizasyon ortamı hazırlanmıştır. Başlatıcı olarak ise APS kullanılmıştır. Elde edilen nano enzimin floresans spektrumu alınmış ve floresans özelliği gösterdiği gözlemlenmiştir. Daha sonra nano enzim sisteminde çalışılacak dalga boyunu belirlemek maksadıyla 300-625 nm aralığında AChE nano enzimi 150 ppm paraokson ile etkileştirilmiş ve floresansın en çok değiştiği dalga boyu çalışılacak dalga boyu olarak seçilmiştir. Yapılan ölçümlerde çalışılacak dalga boyu olarak 300 nm

belirlenmiştir. Daha sonra çalışma pH'sını belirlemek maksadıyla pH 2-9 arasında 150 ppm paraokson numunesi için ölçümler alınmış ve en uygun pH'nın 7,4 olduğu gözlemlenmiştir. Bu maksatla tampon çözelti olarak HEPES (pH=7,4) kullanılmıştır. 300 nm dalga boyu ve 7,4 pH değerinde, 0,01 ppm ile 200 ppm arasında değişen paraokson numunelerinin nano enzim ile etkileştikten sonraki floresans şiddetleri ölçülmüştür. Elde edilen floresans şiddetleri kalibrasyon grafiğine geçirildi. Elde edilen grafikte doğrusala yakın bir ilişki gözlenmiş ve elde edilen regresyon katsayısı 0,9523 olarak bulunmuştur. LOD (Gözlenebilme Sınırı) ve LOQ (Tayin Sınırı) hesaplanması maksadıyla blank (kör) çözeltileri hazırlanarak 5 farklı ölçüm alınmıştır. Hesaplamalar sonucunda LOD değeri, $1,002 \times 10^{-7}$ M, LOQ değeri $2,03 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bize göstermektedir ki geliştirilen yöntemle çok düşük miktarlardaki paraokson numunelerinin analizi yapılabilir.

Üçüncü yöntem olarak; paraokson molekülünü seçici olarak tanıyan ve bağlayan reflaktometrik interferans spektroskopisi (RIFS) temelli sensör geliştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak CMD çip yüzeyine AChE enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon işlemine başlamadan önce CMD çip yüzeyinin aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için CMD çip yüzeyinden 3-dimetillaminopropil-N'-ethylkarbodiimid (EDC) ve N-hidroksisüksinimid (NHS) geçirilmiştir. Yüzey aktivasyonu tamamlandıktan sonra çip yüzeyinden 5 µL/min akış hızında ve 200 µL hacminde 1 ppm AChE geçirilmiştir. Bu işleme kırk dakika boyunca devam edilmiştir. Enzim immobilizasyonundan sonra çip yüzeyinden etanolamin çözeltisi geçirilmiştir. Immobilizasyon işleminin bitiminden sonra temel sinyalde oluşan değişim incelenerek immobilizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir. Sinyalde görülen artış bize immobilizasyonun başarılı olduğunu göstermiştir. Çip yüzeyine AChE enzim immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra farklı derişimlerde paraokson çözeltilerinin analizi yapılmıştır. Bu maksat ile 0,01-200 ppm arasında değişen paraokson çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen ölçüm sonuçları grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu için paraoksonun çalışılan en yüksek derişimi olan $5,4 \times 10^{-4}$ mol/L değerine kadar reflaktometrik interferans spektroskopisinde doğrusala yakın bir ilişki gözlenmiş ve elde edilen regresyon katsayısı 0,9316 olarak bulunmuştur. LOD (Gözlenebilme Sınırı) ve LOQ (Tayin Sınırı) hesaplanması maksadıyla blank(kör) çözeltileri hazırlanarak ölçüm alınmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda LOD değeri $9,9 \times 10^{-8}$ M, LOQ değeri

$1,97 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bize göstermektedir ki geliştirilen yöntemle çok düşük miktarlardaki paraokson numunelerinin analizi yapılabilmektedir.

Dördüncü ve son yöntem olarak; potansiyometrik sensör geliştirilmiştir. Bu amaçla sensörde tanıma tabakası olarak kullanılmak üzere paraokson baskılı polimer hazırlanmıştır. MIP hazırlamak için ilk olarak N-metakriloil-(L)-Serin (MA-Serin) monomerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunun için L-Serin ile metakriloil benzotriazol (MA-Bt) reaksiyona sokulmuştur. Daha sonra MA-Serin molekülü ile paraokson arasında AIBN başlatıcı molekülü varlığında polimerizasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan paraokson baskılı polimer havanda iyice dövülerek toz haline getirilmiş ardından da aktif kömür ve dibütil ftalat ile karıştırılarak bulamaç elde edilmiştir. Elde edilen bulamaç içerisinden bir bakır tel geçecek şekilde cam elektrotun uç kısmına doldurulmuş ve kuruması için 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu şekilde paraokson seçici elektrotumuz hazır hale getirilmiştir. Analizlere başlamadan önce ne kadar süre sonunda ölçümün tamamlandığını, rejenerasyon süresinin ve elektrolitin dengeye gelme zamanını tespit etmek maksadıyla şartlandırma işlemi uygulanmıştır. Şartlandırma süreleri; paraokson için 40 dakika, KOH için 45 dakika, KCl için ise 30 dakika olarak bulunmuştur. Ardından çalışma pH'nın belirlenmesi maksadıyla 10 ppm paraokson içeren pH 2–12 arası fosfat tamponu çözeltileri hazırlanmıştır. 10 ppm paraokson çözeltisi için okunan en yüksek potansiyel değeri pH 7-8 aralığında bulunmuştur. Bundan dolayı yapılan ölçümlerde HEPES tamponu (pH: 7,4) kullanılmıştır. Ardından hazırlanan potansiyometrik sensörle numune analizine geçilmiştir. 0,01-200 ppm arasında değişen derişimlerdeki paraokson numuneleri için ölçümler alınmıştır. Elde edilen potansiyel değerleri grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu için paraoksonun çalışılan en yüksek derişimi olan $7,2 \times 10^{-4}$ mol/L değerine kadar potansiyometrik sensörde doğrusal bir ilişki gözlenmiş ve elde edilen regresyon katsayısı 0,9828 olarak bulunmuştur. LOD (Gözlenebilme Sınırı) ve LOQ (Tayin Sınırı) hesaplanması maksadıyla blank(kör) çözeltileri hazırlanarak ölçüm alınmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda LOD değeri $2,19 \times 10^{-8}$ M, LOQ değeri $1,22 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bize göstermektedir ki geliştirilen yöntemle çok düşük miktarlardaki paraokson numunelerinin analizi yapılabilmektedir. Ardından potansiyometik sensörün seçiciliğinin bulunması için analit olarak parathion kullanılmış ve farklı derişimleri için ölçümler alınmıştır. Parathion molekülünün molekül yapısı paraoksona çok benzediği

için seçicilik tespitinde kullanılmıştır. Paraokson için yapılan ölçümlerde elde edilen potansiyel değerlerinin parathiona kıyasla çok yüksek olduğu görülmüştür. Özellikle düşük derişimlere inildiğinde bu fark çok daha net ortaya konmuştur. 0,01 ppm için paraoksonun ölçülen potansiyel değeri 5,3 mV iken, parathion için ölçülen potansiyel eksi değerlere inmiştir. Bu veriler ışığında seçici elektrotun paraoksone duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır. Seçiciliğin ölçülmesinden sonra geliştirilen paraokson seçici potansiyometrik sensörün girişim etkisi altındaki performansı incelenmiştir. Bunun için paraokson ile parathionun farklı oranlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda 1:1 oranı için 21,4 mV, 1:5 oranı için 20,8 mV ve 1:10 oranı için 20,3 mV değerleri okunmuştur. Bu veriler ışığında %girişim etkisi; 1:1 oranı için %0,46, 1:5 oranı için %3,25 ve 1:10 oranı içinse %5,58 olarak hesaplanmıştır. Buradan yola çıkarak paraoksonun kimyasal yapısına benzer moleküller içeren analiz ortamının girişim etkisinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu sonucuna varılabilir. Hazırlanan tanıma tabakasının analite olan duyarlılığının ortaya konması maksadıyla daha sonra NIP yöntemiyle elde edilen polimer potansiyometrik sensör de tanıma tabakası olarak kullanılmıştır. 0,01-200 ppm arasında değişen paraokson numuneleri için potansiyel ölçümü yapılmıştır. Elde edilen potansiyel değerlerinin negatif yönde ve sıfıra çok yakın olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar göstermekteki MIP yöntemiyle elde edilen paraokson baskılı polimerler elektrot yüzeyinde hedef moleköl olan paraoksone seçicilik göstermektedir. Molekül baskılama prosedürü esnasında paraokson kullanmayarak elde edilen polimerlere ölçüm sırasında paraokson molekülleri bağlanamamış dolayısıyla elde edilen potansiyel değerlerinde değişim olmamıştır.

Tablo 4.1. Geliştirilen sensörlerin LOD(Gözlenebilme Sınırı), LOQ(Tayin Sınırı) değerlerinin karşılaştırılması

Yöntem	LOD (molL ⁻¹)	LOQ (molL ⁻¹)
QCM	4,57x10 ⁻⁸	1,52x10 ⁻⁷
Nano AChE	1,002x10 ⁻⁷	2,03x10 ⁻⁷
RIfS	9,9x10 ⁻⁸	1,97x10 ⁻⁷
Potansiyometrik	2,19x10 ⁻⁸	1,22x10 ⁻⁷

Tablo 4.1 incelendiğinde, gözlenebilme sınırının en düşük olduğu sensörün potansiyometrik sensör olduğu görülmektedir. Ayrıca geliştirilen dört sensörün gözlenebilme sınırı değerlerinin 10⁻⁸-10⁻⁷ molL⁻¹ aralığında olduğu, böylece geliştirilen

dört sensörlede çok düşük derişimlerde paraokson içeren numunelerin analizlerinin yapılabileceği anlaşılmaktadır.

Geliştirilen sensörlerin performansının değeriendirilmesi maksadıyla literatür incelenmiştir. Bu inceleme esnasında yapılan çalışmaların büyük kısmında organofosfatların hidrolizinden yararlanıldığı ve bunun sonucundaki değışimlerin analizin temelini oluşturduğu görülmüştür. Bu şekilde hazırlanmış sensörler ile çalışmamızda geliştirilen sensörler karşılaştırma maksadıyla tabloya geçirilmiş ve Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. *Geliştirilen sensörler ile farklı yöntemlerin karşılaştırılması*

Yöntem	LOD (molL ⁻¹)
pH değışimi temelli sensör [103]	2x10 ⁻⁶
Amperometrik proton seçici sensör [104]	5x10 ⁻⁵
Organofosfor hidrolaz enzimi immobilize camısı karbon elektrot temelli sensör [105]	4x10 ⁻⁷
Karbon pasta elektrotun, organofosfor hidrolaz enzimi baskılı MIP ile modifiyesi temelli amperometrik sensör [106]	1x10 ⁻⁴
QCM	4,57x10 ⁻⁸
Nano AChE	1,002x10 ⁻⁷
RİfS	9,9x10 ⁻⁸
Potansiyometrik	2,19x10 ⁻⁸

Tablo 4.2 incelendiğinde geliştirdiğimiz sensörler ile çok daha düşük miktarlarda paraokson içeren numunelerin analizinin yapılabildiği görülmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Karayılıanoğlu, T. (1996). *Kimyasal, biyolojik ve nükleer silahların tıbbi etkileri*. Ankara: GATA Basımevi.
- [2] Hıncal, F., Çeliker, A., Özgüven, Ş., Kaya, E. (1991). *Kimyasal ve biyolojik savaş ajanlarının sağlık üzerine etkileri*. Ankara: Hacettepe İlaç ve Zehir Bilgi Merkezi.
- [3] Karayılıanoğlu T. (2003). *Kimyasal atakta tıbbi savunma ve pestisitler*. Ankara: GATA Basımevi.
- [4] (2004). NATO glossary of NBC terms and definitions English and French. *North Atlantic Treaty Organization Glossary*, APP(21), 1-8.
- [5] NATO. (1996). *Handbook on the medical aspects of NBC defensive operations*. Washington, D.C.
- [6] Kunak, Z. (2009). *Organofosforlu bileşik maruziyetinde yeni bir oksim molekülünün geliştirilmesi ve etkinliğinin klinik ve biyoanalitik olarak değerlendirilmesi*. Doktora Tezi. Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı.
- [7] Marrs, T.C., Balantyne, B. (2002). *Pesticide toxicology*. New York: Wiley.
- [8] Sunay, S. (2010). *Paraoksonaz polimorfizminin ve paraoksonaz enzim aktivitesinin pestisitlere maruz kalan bireylerde araştırılması*. Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi.
- [9] (2008). Outlooks on Pest Management, *R & D news*, (18), 252-253.
- [10] Şanlı, Y. (1984). Çevre sorunları ve besin kirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, Özel Sayı, 17-37.
- [11] Güler, Ç., Uz, H., Sur, H. (1998). Pestisitler. *Standart Ekonomik ve Teknik Dergi*, 440(37), 54-59.
- [12] Ögüt, S. (2012). *Isparta yöresinde kullanılan bazı pestisitlerin elma-kirazlardaki pestisit kalıntıları ve bu ürünlerin tarımında çalışan tarım işçilerinin kan parametrelerine etkilerin belirlenmesi*. Doktora Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi.
- [13] Gürcan, T. (2001). Tarımsal ilaç kalıntıları ve önemi. *Dünya Gıda Dergisi*, Mayıs Sayısı, 67-72.

- [14] Kaya, S. (1996). Pestisitler ve yol açabileceği başlıca sorunlar. *Çevre ve sağlık birimleri paneli notları*. Ankara: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Konferans.
- [15] Jeyeratnam, J. (1990). Pesticides: poisoning as a global health problem. *World Health Stat.*, Q. 43, 139-144.
- [16] Kamanyire, R. ve Karalliedde, L. (2004). Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occup. Med. (Lond.)*, 54, 69–75.
- [17] Dragonov, D.I. ve Ladu, B.N. (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 369(1), 78-88.
- [18] Bajgar J. (2004). Organophosphates/Nevre Agents poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Advances In Clinical Chemistry*, Vol 38, 152-153.
- [19] Kousba, A.A., Sultatos, L.G., Poet, T.S., Timchalk, C. (2004). Comparison of chlorpyrifos-oxon and paraoxon acetylcholinesterase inhibition dynamics: potential role of a peripheral binding site. *Toxicol. Sci.*, 80(2), 239-48.
- [20] Başkol, G. ve Köse, K. (2004). Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)*, 26 (2), 75-80.
- [21] Hong-Liang L., De-Pei, L. ve Chih-Chuan, L. (2003). Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *J. Mol. Med.*, 81(12), 766-79.
- [22] Rainwater, D.L., Rutherford, S., Dyer, T.D., Rainwater, E.D., Cole, S.A., Vandenberg, J.L., Almasy, L., Blangero, J., Maccluer, J.W., Mahaney, M.C. (2009). Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity*, 102(2), 147 54.
- [23] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B., Mccarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L., Tawfik, D.S. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11(5), 412-19.
- [24] Josse, D., Ebel, C., Stroebel, D., Fontaine, A., Borges, F., Echali r, A., Baud, D., Renault, F., Le Maire, M., Chabrieres, E., Masson, P. (2002). Oligometric states of the detergent solubilized human serum paraoxonase (PON1). *J. Biol. Chem.*, 277(36), 86-97.

- [25] Patocka, J., Kuča, K. ve Jun, D. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – Important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Králové)*, Vol. 47, No. 4.
- [26] Patocka, J., Kuca, K., Jun, D., Cabal J. (2005). Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: In vitro kinetics and thermodynamics. *J.Appl.Biomed.*, 3, 91-99.
- [27] (1995). *Treatment of chemical agent casualties and conventional military chemical injuries field manual*. Washington, DC: Departments of the army, the navy, and the air force and joint manual commandant marine Corps.
- [28] Office of the surgeon general at TMM publications. (1997). *Textbook of Military Medicine*. Washington, D.C.
- [29] Stetter, J. ve Penrose, W. (2002). Understanding chemical sensors and chemical sensors arrays; past, present and future. *Sensors Update*, Vol 10, 189-229.
- [30] Hulanicki, A., Glab, S. ve İngman, F. (1991). Chemical sensors definitions and classification. *Pure&apl. Chem.*, 63 (9), 1247-1250.
- [31] Dondurmacıoğlu, F. (2011). *Ağır metal iyonlarının tayini için optik sensörlerin geliştirilmesi*. Doktora Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi.
- [32] Skoog, D.A., West, D.M., ve Holler, F.J. (1990). *Fundamentals of analytical chemistry*, Saunders College Publishing. Rinehart and Winston Inc., 496 p.
- [33] Gündüz, T. (2002). *İnstrümental analiz*. Ankara: Gazi Kitabevi.
- [34] Eren, H. (2006). *Bütünüyle katı hal pvc membran ve kompozit NO^{-3} seçici potansiyometrik sensörler ve uygulamaları*. Yüksek Lisans Tezi. Samsın: Ondokuz Mayıs Üniversitesi.
- [35] Harris, C.ve Gelb, M. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, 623, 1.
- [36] Shvarev, A.E., Rantsan, D.A. ve Konstantin, M. (2001). Potassium-selective conductometric sensor. *Sensors and Actuators B*, 76, 500-505.
- [37] Ünal, H. (1998). *Hareketli ortamlarda kullanılabilen düşük hücre hacimli katı-hal kompozit elektrotların hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi.
- [38] Beyhan, B. (2008). *HIV-1 tanısına yönelik aptamer bazlı kütle hassas biyosensör geliştirilmesi: tanıyıcı tabakanın oluşturulması*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi.

- [39] Sözmen, N. (2008). *Biyomedikal uygulamalarında akıllı polimer kullanılması ve karakterizasyon yönteminin kuvars kristal mikro dengeleyici sistemler ile geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Başkent Üniversitesi.
- [40] Vaughan, R.D., O'Sullivan, C.K. ve Guilbault, G.G. (1999). Sulfur based self assembled monolayers (SAM's) on piezoelectric crystals for immunosensor development. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364, 54-57.
- [41] Diltemiz, S. (2006). *DNA'yı tanıma bölgelerine sahip moleküler baskılanmış polimer tekniğine dayalı biyosensör geliştirilmesi*. Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi.
- [42] Shons, A., Dorman, F. ve Najarian, J. (1972). The piezoelectric Quartz immunosensor. *J. Biomed. Mater. Res.*, 576-570.
- [43] Pavey, K.D. (2002). Quartz crystal analytical sensors: the future of label-free, real-time diagnostics. *Expert review of Molecular Diagnostics*, 2, 173-286
- [44] Çökeliler, D. (2006). *Alfatoksin tayini için plazma polimerizasyon yöntemi ile kütle hassas immünosensör hazırlanması*. Doktora Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi.
- [45] Karagöz, F. (2015). *Hedef kimyasala duyarlı floresan malzemelerin sentezi ve kimyasal sensörlerde kullanımı*. Doktora Tezi. İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi.
- [46] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H. (2002). *Molecular imprinting: from fundamentals to applications*. Wiley-Vch, New York.
- [47] Kriz, D., Ramstrom, O. ve Mosbach K. (1997). Molecular imprinting: new possibilities for sensor technology. *Anal. Chem.*, 69, 345-349.
- [48] Zhong, N., Byun, H.S. ve Bittman, R. (2001). Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinted polymers. *Tetrahedron Letters*, 42, 1839-1841.
- [49] Ikegami, T., Mukawa, T., Nariai, H., Takeuchi, T. (2004). Bisphenol arecognition polymers prepared by covalent molecular imprinting. *Anal. Chim. Acta.*, 504, 131-135.
- [50] Yu, C. ve Mosbach, K. (1997). Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers. *J. Org. Chem.*, 62, 4057-4064.
- [51] Dickert, F.L. ve Hayden, O. (1999). Imprinting with sensor development On the way to synthetic antibodies. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364, 506-511.

- [52] İdziak, L., Benrebouh, A. ve Deschamps, F. (2001). Simple NMR experiments as a means to predict the performance of an anti-17 alpha-ethynylestradiol molecularly imprinted polymer. *Anal. Chim. Acta.*, 435, 137-140.
- [53] Sellergen, B., Lepistö, M. Ve Mosbach, K. (1988). Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions - NMR and chromatographic studies on the nature of recognition. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5853-5860.
- [54] Lanza, F. ve Sellergren, B. (1999). Method for synthesis and screening of large groups of molecularly imprinted polymers. *Anal. Chem.*, 71, 2092-2096.
- [55] Dimtrienko, S.G., Irkha, V.V. ve Kuznetsova, A.Y. (2004). Use of molecular imprinted polymers for the separation and preconcentration of organic compounds. *J. Anal. Chem.*, 59, 808-817.
- [56] Andersson, L.I. (2000). Molecular imprinting for drug bioanalysis A review on the application of imprinted polymers to solid phase extraction and binding assay. *J. Chromatography, B*, **739**, 163-173.
- [57] Haupt, K. (2001). Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *Analyst*, 126, 747-756.
- [58] Spégel, P., Schweitz, L. ve Nilsson, S. (2002). Molecularly imprinted polymers. *Anal Bioanal Chem.*, 372, 37-8.
- [59] Audrey, F., Chronakis, I.S., (2003), Polymer nanofibers assembled by electrospinning, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 64.
- [60] Rutledge, G.C. ve Fridrikh, S.V. (2007). Formation of fibers by electrospinning, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1384-1391.
- [61] Rodoplu, D. (2011). *Biyosensör uygulamalarına yönelik olarak kuvars kristal mikroterazi yüzeylerin elektro-eğirme yöntemi ile modifikasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi.
- [62] He J., Xu L., Wu Y., Liu Y. (2007). A mathematical models for continuous electrospun nanofibers and electrospun nanoporous microspheres. *Polymer International*, 56, 1323–1329.
- [63] Agarwal S., Wendorff J. H. ve Greiner A. (2008). Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49, 5603–5621.

- [64] Li D., McCann J.T. ve Xia Y. (2006). Electrospinning: a simple and versatile technique for producing ceramic nanofibers and nanotubes. *J. Am. Ceram. Soc.*, 89, 1861–1869.
- [65] Wilm M. S. ve Mann M. (1994). Electrospray and taylor cone theory, dole's beam of macromolecules. *International Mass Spectrometry and Ion Processes*, 136.
- [66] Zıgal, N. (2012). *Nanolıf kaplı kuvars kristal mikroterazi yüzeyler ile kütle hassas biyosensörlerin performansının geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi.
- [67] Subbiah, T., Bhat, G.S., Tock, R.W., Parameswaran, S., Ramkumar, S.S. (2005). Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 96, 557-69.
- [68] Zhong, X. H., Kim, K. S., Fang, D. F., Ran, S. F., Hsiao, B. S., Chu, B. (2002). Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes, *Polymer* , 43, 4403-12.
- [69] Zhao, S. L., Wu, X. H., Wang, L. G., Huang, Y. (2004). Electrospinning of ethyl-cyanoethyl cellulose/tetrahydrofuran solutions. *J Appl. Polym. Sci.*, 91, 242-46.
- [70] Zeng, J., Xu, X., Hen, X., Liang, Q., Bian, X., Yang, L., Jing, X. (2003). Biodegradable electrospun nanofibers for drug delivery. *J. Control. Release* 92, 227-231.
- [71] Son, W.K., Youk, J.H., Lee, T.,S., Park, W.H. (2005). Effect of pH on electrospinning of poly(Vinyl Alcohol). *Materials Letters* , 59, 1571–75.
- [72] Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W., Lim T., Ma Z. (2005). An introduction to electrospinning and nanofibers. *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.*
- [73] Taylor, G.I. (1969). *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, 313, 453.
- [74] Dalton P.D., Klee D. ve Möller M. (2005). Electrospinning with dual collection rings. *Polymer*, 46, 611-614.
- [75] Bergeson, L.L. (2004). The regulatory implications of nanotechnology. *Environmental Quality Management*, 14(1), 71-82.
- [76] Miller, J. C., Serrato, R., Represas-Cardenas, J. M., Kundahl, G. (2004). *The Handbook of nanotechnology*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- [77] <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/nanoteknoloji.pdf> (Erişim tarihi: 20.09.2015)

- [78] Ünlüer, Ö. (2015). *Karbondioksit tutucu ve dönüştürücü biyomimik nanoenzim sistemlerinin geliştirilmesi ve uygulamaları*. Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi.
- [79] Bayındır, M. ve Köylü, Ö. (2006). Türkiye’de nanoteknoloji. *Bilim ve Teknik Dergisi - Yeni Ufuklar*, 469, 1-23.
- [80] Wiesner, M.R., ve Bottero, J. Y. (2007). Environmental nanotechnology. *Applications and Impacts of Nanomaterials*, 395-517.
- [81] http://www.en.wikipedia.org/wiki/History_of_nanotechnology. (Erişim tarihi: 22.09.2015)
- [82] Erkoç, Ş. (2010). *Nanobilim ve nanoteknoloji*. Ankara: ODTÜ Yayıncılık.
- [83] Liveri, F. V. T. (2006). *Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems*. New York: Springer science + Business media, Inc.
- [84] Goldstain, A. (1997). *Handbook of nanophase materials*. New York: Marcel Dekker Inc.
- [85] Lewinski, N., Colvin V. ve Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4, 26-49.
- [86] Doron, A., Katz, E. ve Willner, I. (1995). Organization of au colloids as monolayer films onto glass surfaces: application of the metal colloid films as base interfaces to construct redox-active monolayers. *Langmuir*, 11, 1313-1317.
- [87] <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1079> (Erişim tarihi: 11.10.2015)
- [88] Wang, Z. H., Choi, C. J., Kim, B. K., Kim, J. C., Zhang, D. (2003). Characterization of Fe-Co alloyed nanoparticles synthesized by chemical vapor condensation. *Elsevier*, 57, 3560-3564.
- [89] Winterer, M., Srdic, V., Djenadic, R., Kompch, A., Weirich, T.E. (2007). Chemical vapor synthesis of nanocrystalline perovskites using laser flash evaporation of low nanocrystalline perovskites using laser flash evaporation of low volatility solid precursors. *Rec. Sci. Instr.*, 78, 133903-133908.
- [90] Lee, J. S., Im, S. S., Lee, C. W., Yu, H. J., Choa, Y. H., Oh, S. T. (2004). Hollow nanoparticles of β -iron oxide synthesized by chemical vapor condensation. *Journal of Nanoparticles Research*, 6, 627-631.
- [91] Wang, Z. H., Choi, C. J., Kim, B. K., Kim, J. C., Zhang, D. (2003). Microstructure and magnetic property of Fe-Co nanoparticles prepared by chemical vapor condensation process. *J. of All. And Comp.*, 351, 319-323.

- [92] Choi, C. J., Dong, X. L. ve Kim, B.K. (2001). Characterization of Fe and Co nanoparticles synthesized by chemical vapor condensation. *Scripta Mater*, 44, 2225-2229.
- [93] Li, D., Choi, C.J, Yu, J. H., Kim, B. K., Zhang, Z. D. (2004). Nanocrystalline α -Fe and ϵ -Fe₃N particles prepared by chemical vapor condensation process. *Journal of magnetizm and magnetic materials*, 283, 8-15.
- [94] Choi, C. J., Tolochko, O. ve Kim, B. K. (2002). Preparation of iron nanoparticles by chemical vapor condensation. *Materials Letter*, 56, 289-294.
- [95] Jung, S.S., Kang, Y.S., ve Lee, J. S. (2007). The optimization of hydrogen reduction process for mass production of Fe-8wt%Ni nanoalloy powder. *Material Science Forum*, 534, 153-156.
- [96] Khedr, M. H., Farghali, A.A. ve Abdelkhalek, A. A. (2007). Microstructure kinetics and mechanism of nano-crystalline CuFe₂O₄ reduction in flowing hydrogen at 300-600 °C for the production of metallic nano-wires. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 78, 1-6.
- [97] Hu, Y., Li, C., Gu, F., Zhao, Y. (2007). Facile flame sythesis and photoluminescent properties of core/shell Ti₂O₂/Si₂O₂ nanoparticles. *Journal of Alloys and Compunds*, 432, 5-9.
- [98] Chang, H., Park, J. H. ve Jang, H. D. (2007). Flame sythesis of silica nanoparticles by adopting two fluid nozzle spray. *Colloids and Surf. A: Physicochem. Eng Aspects*, 187.
- [99] Gürmen, S., Friedrich, B. ve Stopic, S. (2006). Synthesis of nanosized spherical cobalt powder by ultrasonic spray pyrolysis. *Mater. Res. Bull.*, 41, 1882-1890.
- [100] Say, R., Ersoz, A., Hur, D., Yılmaz, F., Denizli, A., Atılır Özcan, A, Emir Diltemiz, S., Yazar, S., Biçen, Ö., Büyüktiryaki, S., Keçili, R., Saka, G., Fındık, T. (16.06.2011.). Photosensitive aminoacid-monomer linkage and bioconjugation applications in life sciences and biotechnology. U.S. Patent, No: WO/2011/070402.
- [101] Köse, E. (2015). *Yapısında birden fazla fonksiyonu barındıran hetero nano-enzim yapılar ve elisa uygulamaları*. Y. Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi.
- [102] Cecile, C. ve Hsieh, Y.L. (2009). Hydrophilic polystyrene/maleic anhydride ultrafine fibrous membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 115, 730-723.

- [103] Wang, J., Krause, R., Block, K., Musameh, M., Mulchandani, A. (2009). Dual amperometric-potentiometric biosensor detection system for monitoring organophosphorus neurotoxins. *Analytica Chimica Acta*, 469, 197-203.
- [104] Hossain, M., Faisal, M., Kim, C., Cha, H., Nam, S., Lee, J. (2011). Amperometric proton selective strip-sensors with a microelliptic liquid/gel interface for organophosphate neurotoxins. *Electrochemistry Communication*, 13, 611-614.
- [105] Lei, C., Valenta, M.M., Saripalli, K.P., Ackerman, E.J. (2007). Biosensing paraoxon in simulated environmental samples by immobilized organophosphorus hydrolase in functionalized mesoporous silica. *J. Environ. Qual.*, 36, 233-238.
- [106] Z. Meng, T. Yamazaki ve K. Sode. (2003). Enhancement of the catalytic activity of an artificial phosphotriesterase using a molecular imprinting technique. *Biotechnol. Lett.*, 25, 1075-1080.