

Klenbuterol Tayini İçin Altın Nanopartikül Katkılı Potansiyometrik İmmunosensör
Geliştirilmesi

Burcu Yazıcı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Şubat 2017



Development of Gold Nanoparticle-Coated Potentiometric Immunosensor for
Clenbuterol Detection

Burcu Yazıcı

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

February 2017

Klenbuterol Tayini İçin Altın Nanopartikül Katkılı Potansiyometrik İmmunosensör
Geliştirilmesi

Burcu Yazıcı

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

Danışman: Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük

Şubat 2017

ONAY

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Burcu Yazıcı'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Klenbuterol Tayini İçin Altın Nanopartikül Katkılı Potansiyometrik İmmunosensör Geliştirilmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük

Üye : Prof. Dr. Sibel Akar

Üye : Doç. Dr. Tufan Güray

Üye : Doç. Dr. Sibel Emir Diltemiz

Üye : Yrd. Doç. Dr. Özlem Biçen Ünlüer

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

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük danışmanlığında hazırlamış olduğum “Klenbuterol Tayini İçin Altın Nanopartikül Katkılı Potansiyometrik İmmunosensör Geliştirilmesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu, tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi, tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 10/02/2017

Burcu Yazıcı

İmza

ÖZET

Klenbuterol, sempatik sinir sistemi uyarıcısı olarak kullanılan bir β_2 -reseptörüdür. Klenbuterol azot tutucu, yağ depolamayı azaltıcı özelliğe sahiptir ve besin dönüşümünü etkiler. Anabolik etkisi, protein sentezini artırmasının sonucudur. Klenbuterol anabolik etkisinden dolayı özellikle sporcular tarafından vücut geliştirmek amacıyla da kullanılmaktadır. Çiftlik hayvanlarının beslenmesinde klenbuterolun, yem katkı maddesi olarak kullanıldığı yasadışı birçok uygulama da mevcuttur. Bu nedenle, hassas, spesifik ve kullanışlı bir analiz, hayvan beslemelerinde, dokularda, kanda ve idrarda bulunan klenbuterol kalıntılarının yerinde tespiti için gereklidir.

Bu amaçla, klenbuterol tayini için; basit, ucuz ve etkili bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Klenbuterol molekülü için yüksek seçicilikte olan nano anti-klenbuterol antibadi polimeri hazırlanmış ve immunosensör yapımında kullanılmıştır. İlk aşamada; nano anti-klenbuterol antibadinin sentezinde kullanılacak monomer olan MAT-Ru-MuABt sentezlenmiş, karakterizasyonu ^1H NMR ile gerçekleştirilmiştir. Anti-klenbuterol antibadi ile modifiye edilen MAT-Ru-MuABt monomerleri, uygun çapraz bağlayıcı varlığında polimerleştirilip, nano anti-klenbuterol antibadi elde edilmiştir.

İkinci aşamada; altın nanopartikül (AuNP) sentezlenmiş ve nano anti-klenbuterol antibadinin modifiyesinde kullanılmıştır. Karakterizasyonu SEM ile gerçekleştirilmiştir.

Son aşamada ise; hazırlanan nano anti-klenbuterol antibadi ve altın nanopartikül modifiye edilmiş nano anti-klenbuterol antibadi ile iki farklı immunosensör hazırlanmıştır. Hazırlanan bu immunosensörlerin potansiyel cevabı, pH, cevap süresi, seçiciliği ve tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Klenbuterol, İmmunosensör, Potansiyometrik sensör, AuNP

SUMMARY

Clenbuterol is a β_2 -receptor used as a stimulator of the sympathetic nervous system. Clenbuterol nitrogen retainer has oil storage reduction function and affects nutrient conversion. The anabolic effect is the result of increasing protein synthesis. Clenbuterol is also used by bodybuilding athletes due to its anabolic effect. A lot of cases which illegal application of clenbuterol as feed additives in feeding farm animals exist. Therefore, a sensitive, specific and convenient assay is essential for on-site detection of ultra trace residue of clenbuterol in animal feeds, tissues, bloods and urines.

For this purpose, a simple, inexpensive and effective method was developed for the determination of clenbuterol. The highly selective nano anti-clenbuterol antibody polymer for the clenbuterol molecule was prepared and used in immunosensor construction. First stage; MAT-Ru-MuABt, a monomer for synthesis of nano anti-clenbuterol, was synthesized and characterized by ^1H NMR. MAT-Ru-MuABt monomers modified with anti-clenbuterol antibody were polymerized in the presence of a suitable crosslinker and nano anti-clenbuterol antibody was obtained.

In the second stage; gold nanoparticle (AuNPs) was synthesized and used in the nano anti-clenbuterol modification. Gold nanoparticle characterized by SEM.

In the last stage; two different immunosensors were prepared with the prepared nano anti-clenbuterol antibody and gold nanoparticle-modified nano anti-clenbuterol antibody. Potential response, pH, response time, selectivity and reusability of these prepared immunosensors were examined.

Keywords: Clenbuterol, Immunosensor, Potentiometric sensor, AuNPs

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bilgi birikimini ve desteğini benden esirgemeyen, sabır ve hoşgörü ile her zaman yanımda olan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük'e,

Teorik ve deneysel çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübeleriyle desteğini her zaman hissettiren değerli hocam Prof. Dr. Rıdvan Say'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen hocalarım, Doç. Dr. Filiz Yılmaz, Doç. Dr. Sibel Emir Diltemiz, arkadaşım Semra Özgün Günay'a

Çalışmalarımı örnek aldığım, aynı zamanda jüri komisyonumda yer alan hocalarım Prof. Dr. Sibel Akar, Doç. Dr. Tufan Güray, Yrd. Doç. Özlem Biçen Ünlüer'e

Deneysel çalışmalarımındaki yardımlarının yanı sıra manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim dostlarım, Şeyma Avcı, Deniz Uğurağ, Andaç Arslan, Berfu Engin, Yasemin Uymaz, Ayça Bakır, Derya Karaarslan, Fatma Yediyıldız, Gözde Yavuz, Şebnem Bindaş, Kemal İlterberk'e

Hayatımın her evresinde, aldığım her kararda yanımda olan, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem Pakize Yazıcı, babam Ertan Yazıcı'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1. Kalıntı Analizi	3
2.1.1. Antibiyotikler	3
2.1.2. Anabolik maddeler	5
2.1.3. Vitamin ve mineraller.....	9
2.1.4. Rumen sindirimi değiştiricileri.....	9
2.1.5. Enzimler ve probiyotikler.....	10
2.1.6. Nöroleptikler.....	10
2.1.7. β_2 -adrenerejik reseptör uyarıcıları.....	10
2.1.7.1. <u>Klenbuterol</u>	10
2.2. Literatür Taraması	13
2.3. Antikor-Antijen İlişkisi.....	15
2.3.1. Antikorlar	15
2.3.2. Antikor-antijen bağlanma özellikleri.....	17
2.3.3. Antijen-antikor bağlanma kinetiği.....	19

İÇİNDEKİLER (devam)

2.4. Nanopartiküller.....	19
2.5. Sensörler.....	20
2.5.1. Kimyasal sensörler.....	21
2.5.1.1. <u>Biyosensörler</u>	23
2.5.1.2. <u>Elektrokimyasal sensörler</u>	24
2.5.1.3. <u>Referans elektrotlar</u>	26
2.5.1.4. <u>İndikatör elektrotlar</u>	30
2.5.1.5. <u>İyon seçici membranların özellikleri</u>	34
2.5.1.6. <u>İyon seçici elektrotların performansını belirleyen faktörler</u>	35
2.5.1.7. <u>İyon seçici elektrotların seçicilik yöntemleri</u>	39
2.5.1.8. <u>İyon seçici elektrotların avantaj ve dezavantajları</u>	41
3. MATERYAL VE YÖNTEM	43
3.1. Materyal.....	43
3.1.1. Kullanılan kimyasallar.....	43
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	43
3.2. Yöntem.....	44
3.2.1. MAT-Ru-MuABt hazırlanışı.....	44
3.2.1.1. <u>Diklorobis (2-2'-bipiridil) rutenyum (RuCl₂(bipy)₂)</u>	44
3.2.1.2. <u>Klorobis (2-2'-bipiridil) MAT-rutenyum (RuClMAT(bipy)₂)</u>	44
3.2.1.3. <u>Bis (2-2'-bipiridil)-MAT-MuABt-rutenyum (RuMAT(MuABt)(bipy)₂)</u> ... 45	
3.2.2. Karakterizasyon.....	45
3.2.2.1. <u>MALDI-TOF/MS</u>	45
3.2.2.2. <u>¹H NMR</u>	46
3.2.3. Altın nanopartikül sentezi.....	46
3.2.4. Nano anti-klenbuterol antibadi hazırlanışı.....	46
3.2.5. Nano anti-klenbuterol antibadi-AuNP hazırlanışı.....	46
3.2.6. İmmunosensörün hazırlanışı.....	46
3.2.6.1. <u>Potansiyel ölçüm sistemi</u>	47

İÇİNDEKİLER (devam)

3.2.6.2. <u>İmmunosensörün performansının değerlendirilmesi</u>	48
3.2.7. Gerçek örnek hazırlanması	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	51
4.1. Karakterizasyon	51
4.1.4. Nano anti-klenbuterol antibadi-AuNP	54
4.2. İmmunosensör ile Yapılan Ölçümler	54
4.2.1. Derişim etkisi	54
4.2.2. pH'nın etkisi	55
4.2.3. Cevap süresi	56
4.2.4. Seçicilik çalışmaları	57
4.2.5. Analitik performans	58
4.2.6. İmmunosensörün tekrar kullanılabilirliği ve ömrünün belirlenmesi	60
4.3. Gerçek örnek analizi	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR DİZİNİ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Klenbuterol'ün yapısı	11
Şekil 2.2. Antikorların genel yapısının şematik gösterimi	15
Şekil 2.3. Bir sensörün çalışma mekanizması.	21
Şekil 2.4. Potansiyometrik bir sistem	26
Şekil 2.5. Kalomel elektrot.....	28
Şekil 2.6. Ag/AgCl elektrot	29
Şekil 2.7. Referans hidrojen elektrot	30
Şekil 2.8. İyon seçici elektrot kullanılarak oluşturulan potansiyometrik hücrenin şeması .	32
Şekil 2.9. Doğrusal çalışma aralığı	36
Şekil 2.10. İyon-Seçici elektrotların tayin sınırlarının belirlenmesini gösteren grafik	37
Şekil 2.11. IUPAC'a göre cevap zamanı (t_{95})	38
Şekil 3.1. Karbon pasta elektrot.....	47
Şekil 3.2. Potansiyel ölçüm sistemi	48
Şekil 4.1. MALDI-TOF/MS Ru(bpy) ₂ Cl ₂ spektrumu	51
Şekil 4.2. Klorobis (2-2'-bipiridil) MAT-Rutenyum	52
Şekil 4.3. Bis(2-2'-bipiridil)-MAT-MuABt-Rutenyum(II)	53
Şekil 4.4. Nano anti-klenbuterol antibadi-AuNP SEM görüntüsü	54
Şekil 4.5. İmmunosensöre derişimin etkisi(pH:6, C: $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-10}$ mM, T: 25 °C) .	55
Şekil 4.6. İmmunosensöre pH etkisi (C: $1,0 \times 10^{-4}$ mM, T: 25 °C).....	56
Şekil 4.7. İmmunosensörün cevap zamanı (pH:6,0, C: $1,0 \times 10^{-4}$ mM, T:25°C).....	57
Şekil 4.8. Modifiye edilmemiş immunosensörün doğrusal çalışma aralığı(pH:6,0,T:25 ⁰) .	58
Şekil 4.9. AuNP modifiye immunosensörün doğrusal çalışma aralığı (pH:6,0, T:25 ⁰ C)...	59
Şekil 4.10. İmmunosensörün tekrar kullanılabilirliği(pH:6,0,C: $1,0 \times 10^{-4}$ mM, T:25 ⁰ C).....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

4.1. AuNP modifiye immunosensörün ve AuNP modifiye edilmemiş immunosensörün farklı metodlarda hesaplanmış seçicilik katsayıları.....	58
4.2. İmmunosensörün tayin limitinin literatür ile karşılaştırılması	59
4.3. Standart ilave yöntemi ile sütteki klenbuterol tayini	62



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
μg	Mikrogram
ΔE	Potansiyel farkı
Å	Angström
a_i	İyon aktivitesi
E	Çalışma Elektrodu Potansiyeli
e^-	Elektron
E^0	Standart Elektrot Potansiyeli
F	Faraday sabiti
g	Gram
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
L	Litre
$\ln e$	Tabanında Logaritma
Log	Logaritma
M	Molarite
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
ppb	Milyarda Kısım
ppm	Milyonda Kısım
R	Gaz sabiti
T	Sıcaklık
V	Volt
vd.	Ve diğerleri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Au	Altın
AuNP	Altın nanopartikül
NH ₂	Amino
NH ₃	Amonyak
NH ₄ ⁺	Amonyum
APS	Amonyum persülfat
NO ₂	Azot dioksit
NO	Azot monoksit
Cu	Bakır
bpy	Bipiridil
Hg	Civa
Hg ₂ Cl ₂	Civa (I) klorür
Hg ⁺²	Civa (II) iyonu
HgCl	Civa (II) klorür
DNA	Deoksiribonükleik asit
F ⁻	Florür
Ag	Gümüş
Ag ⁺	Gümüş iyonu
AgCl	Gümüş klorür
Ag ₂ S	Gümüş sülfür
Ir	İridyum
ISE	İyon seçici elektrot
Cd	Kadmiyum
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
COOH	Karboksil
CO ₂	Karbondioksit
CL	Klenbuterol
Cl ⁻	Klorür

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Pb	Kurşun
S ²⁻	Kükürt anyonu
Li ⁺	Lityum iyonu
NO ₃ ⁻	Nitrat
Pd	Paladyum
Pt	Platin
PEG	Polietilenglikol
PVA	Polivinil alkol
PVC	Polivinil klorür
K ⁺	Potasyum iyonu
KCl	Potasyum klorür
RNA	Ribonükleik asit
SSS	Santral sinir sistemi
Na ⁺	Sodyum iyonu
NaCl	Sodyum klorür
SHE	Standart hidrojen elektrodu
IUPAC	Uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliği

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde veteriner ilaçlarının kullanım zorunlulukları ile birlikte, bilinçsizce uygulanmaları, besinlerin, veteriner ilaç kalıntıları ile kirlenme riskini artırmıştır. Hayvanlarda, hastalıkların tedavisi ve gelişmenin hızlandırılması amacıyla yem ya da suya katılan kimyasal maddeler, doku ve organlarda birikme yapar. İlaç uygulanmış hayvanlardan elde edilen gıdalarda bulunan, farmakolojik etkiye sahip etkin maddenin kendisi, parçalanma ürünleri ya da metabolizma ürünleri **“kalıntı”** olarak tanımlanır. Besin değeri olan hayvanlara uygulanan bu tür ilaçların, hayvansal ürünlere geçen kalıntıları besin kirlenmesine neden olarak tüketicilerde zehirlenmelere, cinsiyet özellikleri ve davranışlarda değişimlere, üreme bozukluklarına, teratojenik, mutajenik, karsinojenik etkilere ve dirençli suşların ortaya çıkmasıyla uygulanan ilaçların etkilerinin azalması gibi olumsuzluklara yol açmaktadır (Paulson vd., 1992; Threlfall vd., 1994; Thomson ve Sporns, 1995; Coffman ve Beran, 1999; Kaya vd., 2002a; Öztürk, 2002).

Anabolik steroidlerden olan klenbuterol, β_2 -agonist bir ilaçtır. İnsanlarda astım tedavisinde akciğerde nefes darlığından oluşan salgıların azaltılmasını sağlaması sebebiyle, uterus gevşetici (tokolitik) olarak da veteriner hekimlikte kullanılmaktadır. Bunların dışında, anabolik etkisi sebebiyle sporcular tarafından da vücut geliştirme amacıyla sıkça kullanılır. Klenbuterolün anabolik etkisi, protein sentezini artırması, yağ depolamayı azaltması ve azot tutucu özellikte olmasından kaynaklanmaktadır. Veterinerlikte et ve süt üretiminde kullanılan klenbuterolün sebep olduğu artıkları, insanlarda sağlık açısından yüksek risk oluşturmaktadır (Nan Liua, 2009). Hatta klenbuterol tedavisi görmüş hayvanın etinin ya da sütünün tüketilmesi halinde ölüme bile sebep olabilmektedir. Bu nedenle, biyolojik örneklerde klenbuterolün analitik tayini büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan birkaçı;

- HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) (Botterblom vd., 1993; Chang vd., 2005; Morales-Trejo vd., 2013).
- GC-MS (Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi) (Amendola vd., 2002; Ramos vd., 2003).

- LC-MS (Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi) (Blanca vd., 2005; Courant vd., 2009; Dominguez-Romero vd., 2013).
- ELISA (Enzim bağı immunosorbent test) (Prezelj vd., 2003).
- İki boyutlu sıvı kromatografisi (Guo vd., 2016).
- Elektrokimyasal immunosensör (Talib vd., 2016).
- Elektrokemilüminesans immünosensör (Li vd., 2013).
- İyon seçici elektrot (Liang vd., 2012).

Bahsedilen bu yöntemlerde, kullanılan ekipmanların pahalı olması, uzun işlem gerektirmesi ve pratik olmamasının yanında, ekipmanları kullanmak ve sonuçları değerlendirmek için uzman kişilere ihtiyaç duyulması tayini zorlaştırmaktadır. Bu nedenlerle klenbuterolün tayini için yüksek hassasiyete sahip, kolay uygulanabilir, düşük maliyetli ekipmana sahip, çok düşük derişimlere inebilen ve ek saflaştırmaya ihtiyaç duymayan bir yöntemin uygulanması hedeflenmiştir.

Çalışmamızda, altın nanopartikül (AuNP) modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş nano anti-klenbuterol ile hazırlanan immunosensörlerin potansiyometrik davranışları incelenmiştir. İlk aşamada; nano anti-klenbuterolün sentezinde kullanılacak monomer olan MAT-Ru-MuABt sentezlenmiştir. Anti-klenbuterol antibadi ile modifiye edilen MAT-Ru-MuABt monomerleri, uygun çapraz bağlayıcı varlığında polimerleştirilip nano anti-klenbuterol antibadi elde edilmiştir. İkinci aşamada; altın nanopartikül sentezlenmiş ve nano anti-klenbuterol antibadi, altın nanopartikül ile modifiye edilmiştir. Son aşamada ise; hazırlanan nano anti-klenbuterol antibadi ve altın nanopartikül modifiye edilmiş nano anti-klenbuterol antibadi ile iki farklı immunosensör hazırlanmıştır. Hazırlanan bu immunosensörlerin potansiyel cevabı, pH, cevap süresi, seçiciliği ve tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Kalıntı Analizi

Hayvanlarda hastalıkların tedavisi, önlenmesi ve kontrolünün yanında gelişimi hızlandırmak için doğrudan, yem veya suya katılan ilaç ve diğer kimyasal maddeler, doku ve organlarda birikme yapar. Biriken bu kimyasal maddeler ve ilaçlar “**kalıntı**” olarak adlandırılmaktadır.

İlaç ve kimyasal maddelerin, insan ve hayvanlar tarafından tüketilene kadar yemlerde ve besinlerde bulunmasına izin verilen miktarına “**tolerans düzeyi**” denir. Doku ve organlardaki tolerans düzeyinin üstündeki tüm kalıntılar, toksikolojik olarak önem taşımakta ve tehlikeli kabul edilmektedir (Kaya ve Ünsal, 2000).

Hayvanlarda, büyümeyi hızlandırmak, hayvansal ürünlerin verimini artırmak ve kilo kaybını önlemek amacıyla, anabolik maddeler, antibiyotikler, vitamin ve mineraller, rumen sindirimi değiştiricileri, nöroleptikler, β_2 reseptör uyarıcıları, enzim ve bakteri kültürleri sıklıkla kullanılmaktadır (Kaya ve Pirinççi, 2007).

2.1.1. Antibiyotikler

Antibiyotiklerin büyük çoğunluğu mantarlar ve bakteriler tarafından sentezlenen ya da yarı sentetik olarak elde edilen, çok düşük yoğunluklarda bile, hastalık etkenlerinin gelişme ve üremelerini durduran veya onları öldüren kimyasal maddelerdir (Libby, 1975; Sanlı, 1988).

Antibiyotiklerin, tedavi edici ve koruyucu olarak kullanılmaları 1928’de Penisilin’in keşfi ile başlamaktadır. Penisilin enfeksiyonal hastalıklar üzerindeki kesin etkisi anlaşıldıktan sonra diğer doğal kaynaklı antibiyotiklerin araştırılması yoğunlaştırılmıştır. Böylece 1942’de Klortetrasiklin ve Aueomisinin, 1944’de

Streptomisin, 1947'de Polimiksin, 1950'de Kloramfenikol ve Kloromisetin ile diğer antibiyotiklerin bulunması birbirini izlemiştir (Kayaalp, 1989; Şanlı, 1988).

Ülkemizde, veteriner hekimlikte, 1991 yılı sonu itibariyle ruhsatlandırılıp üretimi yapılan 350'den fazla ilacın 100'den fazlasını antibiyotik ve benzer etkili ilaçlar oluşturmaktadır. Ayrı ayrı veya bir kaçını birlikte içeren ve 46 etkin madde halinde çeşitli şekillerde hazırlanmış ilaç, arılar da dahil, evcil hayvanlarda çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Bunlar içinde özellikle aminoglikozid, penisilin, tetrasiklin ve makrolid grubundaki bazı ilaçlar ile kloramfenikol sığırlarda geniş uygulama alanı bulmuştur (Anonim, 1991; Nouws, 1981; Tmaz, 1992).

Modern hayvan yetiştiriciliğinde genç hayvanlara, yetiştirme hastalıklarının önüne geçilmesi için belirli miktarlarda antibiyotiğin verilmesi önerilmektedir. Antibiyotikler, genç hayvanların beslenme değişikliğinde, iklim ve ahır değiştirmede ve transport sırasında oluşan yorgunluk ve halsizliklerin önlenmesinde de kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada yem rasyonlarına katılan antibiyotiklere bağlı olarak, kanatlılarda %15-16, genç hayvanlarda %20, danalarda %5-10, domuzlarda %8-12 oranında vücut ağırlığı artışının meydana geldiği saptanmıştır (Uğur, 1978).

Antibakteriyel ilaçlar veteriner hekimliğinde, bakteriyel ve tek hücreli mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıklarda, tedavi ve koruma amaçlı sıklıkla kullanılmaktadır. Tedavi amacıyla ve sağlıklı hayvanlarda ise koruyucu dozlarda genellikle iki haftaya kadar kullanılan antibakteriyel ilaçlar, hastalıkların oluşma riskinin azaltılması, gelişimin hızlandırılması, yemden yararlanma ve verimi artırmak sebebiyle bazen, tüm hayatları boyunca uygulanmaktadır (Goldman, 2004; Kaya vd., 1992).

Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılan antibiyotiğin %84'ü hayvancılık sektöründe kullanılmaktadır. Bu oranın %78,5'i çiftlik hayvanlarında koruma ve büyümeyi hızlandırma, %5,7'i ise tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca, antibiyotiklerin az bir miktarı (%0,1), bazı bitkilerde bakteriyel patojenlerden korumak için pestisid olarak; %2,8'i küçük hayvan hekimliğinde köpek ve kedilerin tedavisinde ve %13'nün insanların tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir (Goldman, 2004).

Antibiyotiklerin büyüme ve beslenmedeki etkileri aşağıdaki teorilerle açıklanmıştır;

- Antibiyotikler, besin elementlerini kullanan mikroorganizmaları inhibe edebilirler.
- Yedek besin elementleri olabilirler (Vitamin, aminoasit ve enerji alımında yedek madde olabilirler).
- Gıda maddesi veya su alımını artırabilirler.
- Toksin üreten mikroorganizmaları inhibe edebilirler.
- Besin unsurlarının sindirim ve absorpsiyonunu hızlandırabilirler (Webb ve Taylor, 1990).

2.1.1.1. Kullanılan antibiyotiklerin sağlık yönünden etkileri

Hayvanlarda, koruyucu ve büyüme hızlandırıcı olarak antibiyotik kullanımı sonucu meydana gelen dirençli bakteri suşlarının, bu hayvanların tüketilmesi sırasında insanlara bulaşması sonucu hastalığa sebep olabilmekte ve tedavisinde ise bakterilerin direnç gösterdiği ilaçlar kullanıldığında tedavi başarısız olabilmektedir (Goldman, 2004). Besinlerde var olan bazı antibakteriyel ilaç kalıntıları, çeşitli alerjik reaksiyonlara, bazı doku ve organların hasar görmesine sebep olmaktadır (Edder vd., 1999).

Sindirim sisteminde; bulantı, kusma, iştahsızlık, ishal, süper enfeksiyon.

Hemopoetik sistemde; kansızlık, alyuvarlarda parçalanma, trombositlerde azalma, serum hastalığı, kemik iliğinde depresyon.

Sinir sisteminde; nörolojik bozukluklar, epilepsi, şuur bulanıklığı, denge yeteneği bozukluğu, periferik sinirlerde bozukluk ve felçler.

İdrar yollarında; idrar yapamama, idrarda albümin ve kristal görülmesi.

Dolaşım sisteminde; arterial basıncın düşmesi, ödem, damar cidarı iltihabı.

Diğer sistemlerde; Çeşitli alerjik reaksiyonlar, hepatit, solunum merkezi felci, solunum güçlüğü, troid bezinde büyüme, gözde çeşitli bozukluklar, dişlerde bozukluklar, büyümede yavaşlama, deri döküntüleri, ağırlık kaybı (Şanlı, 1984; Kamber, 1990).

2.1.2. Anabolik maddeler

1930'larda cinsiyet hormonu östrojenin, kanatlı ve sığırlarda büyümeyi artırdığının tespit edilmesi ve kimyasının anlaşılmasıyla birçok miktarda hormonun sentetik olarak üretimi mümkün olmuştur. Böylece, 1947'de tavukların ve 1954'te de sığırların gelişimini

hızlandırmak amacıyla sentetik östrojenler kullanılmaya başlanmıştır. Dietilstilbestrol (DES), piliçlerde ABD’de ticari kullanılan ve östrojenik olarak üretilen ilk sentetik hormonlardan biridir. Ayrıca, dietilstilbestrol insanlarda da ilaç olarak kullanılmıştır. Dietilstilbestrolün kansere sebep olduğu anlaşıldıktan sonra 1959’da piliçlerde ve 1979’da sığırlarda kullanımı yasaklanmıştır (Kaya ve Pirinçci, 2007).

Hormonlar kimyasal olarak steroid veya protein yapıda bulunurlar. Steroid yapılu hormonlar, sindirim kanalından emilerek vücutta etkinliklerini devam ettirirler. Örneğin, steroid hormonu olan doğum kontrol hapları da ağızdan alınırlar. Protein yapıdaki hormonlarsa midede parçalanır ve ağızdan alınmaları durumunda vücutta etkinlik gösteremezler. Bu nedenle, protein yapılu hormonların etki oluşturması için vücuda enjeksiyon ile verilmesi gerekir (Kaya ve Pirinçci, 2007).

Anabolik maddeler, vücutta azotun tutulmasına, proteinler ve aminoasitlerin parçalanmasının azalmasına sebep olarak kas kitlesini artırır ve vücutta, azot yanında, Na, K, S, P ve Cl tutulmasına da yol açarlar. Bunun dışında anabolik maddeler, eritropoetin (glikoprotein hormonu) sentezinin artmasının yanında, kemik iliğindeki kan yapıcı merkezin uyarılmasına yol açarak, kan yapımının da artmasına neden olmaktadır. Androjenik-anabolik maddeler kemiklerde uzunlamasına büyümeyi hızlandırarak, genç-büyüme dönemindeki hayvanlarda boy uzamasına sebep olurlar (Şener, 1994; Kayaalp, 1990; Kaya, 1994; Kaya, 1984; Ergün, 1988). Bu etkileri ile anabolik maddeler hayvanlarda canlı ağırlık artışını %10-25, yemden faydalanmayı %5-10 artırır. Anabolik maddeler, kas kitlesi ve kemik biçimlenmesini artırıcı, yağ depolarını ise azaltıcı yönde değiştirirler; çünkü, kas ve kemik dokunun sentezi için gerekli enerji miktarı aynı ağırlıktaki yağın sentezi için gerekenden daha az ve karkastaki (yapı iskeleti) su oranı da vücut yağından daha yüksektir. Bunun sonucu olarak, hormon uygulanan hayvanlarda hormon uygulanmayan hayvanlara göre belirli miktarda verilen yem daha fazla canlı ağırlık artışı sağlamaktadır (Kaya ve Pirinçci, 2007).

Anabolik maddelerin kullanılma amaçları;

- Gelişimi hızlandırmak ve yemden yararlanma oranını artırmak,
- Kronik olarak zayıflatan hastalıklarda protein sentezini artırmak,

- Anemilerde kan yapımını artırmak.

Hayvanlarda gelişimi hızlandırmak amacıyla anabolik madde kullanımının en önemli sakıncası, kesim öncesi bekletme süresine uyulmadığı takdirde, hayvanların yenilenebilir doku ve organlarında kalıntı bırakmalarıdır. İstenmeyen bu durum nedeniyle, 88/146/EEC numaralı talimatla 01.01.1989 tarihinden itibaren AB ülkelerinde anabolik maddelerin kullanılması ve hormonlu etlerin ithalatı yasaklanmıştır. Ülkemizde Tarım Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün 07.08.1989 tarih ve 6 sayılı genelgesiyle ithalatı yapılan canlı hayvan ve karkas (yapı iskeleti) etlerinin hormon kalıntıları bakımından analizlerinin yapılmasını zorunlu kılmıştır. Bu sebeple, 1989-1995 yılları arasında, çeşitli hayvan türlerine ait 18161 et ve idrar örneği analiz edilmiş; 67 idrar numunesinde 19-nortestosteron (32 örnek), zeranol (2 örnek) ve östradiol-7b (33 örnek) kalıntısı bulunmuştur. Bakanlık tarafından aynı dönemde iç piyasadan sağlanan 1317 sığır etinin (örneklerin kulak altı bölgesinden alındığı belirtilmiştir) 7'sinde 21-180 ppb arasında zeranol kalıntısı tespit edilmiştir (Kaya ve Pirinçi, 2007).

Kalıntı miktarı ve maruziyet süresi dikkate alınmadan bir değerlendirme yapıldığında, bu tür kalıntı içeren besinleri tüketen insanların, cinsiyet özelliklerinde değişikliklerin yanında, çeşitli doku ve organlarda tümör artışı olabileceği öngörülür. Özellikle gebelik önleyici olarak, uzun süreli kullanıldığında, östrojenik maddeler başta meme bezi, böbrek, testis, uterus, kemik, diğer doku ve organlarda tümörlerin gelişimine neden olurlar. Örneğin; östrojenik maddeler endometriyal kanser sıklığında 5-15, meme tümörlerinde ise 2-6 kat artışa sebep olabilir. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda ise, bu maddelerin çeşitli doku ve organlardaki tümöral gelişmelere kendi reseptörlerine olan etkilerinin aracılık ettiği ve bu yapıların cinsiyet hormonu reseptör sıklığıyla yakın ilişkili olmakla birlikte, bu etkiye fizyolojik miktarın çok üzerindeki miktarlarda yol açıldığı ortaya konulmuştur.

Anabolik maddelerin uygulandığı hayvan üzerinde de olumsuz etkileri bulunmaktadır. Örneğin; östrojenler iğdiş danalarda dişilik belirtilerinin ortaya çıkmasına yol açarak, hayvanın besicilikten çıkarılmasına ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

ABD’de (Yeni Zelanda, Avustralya ve Kanada’da da) gelişmeyi artırıcı olarak kullanılmak üzere onaylanmış 6 farklı steroid hormon bulunmaktadır. Bunlar; östradiol, progesteron, testosteron, zeranol, trenbolon asetat ve melengestrol asetatdır. Östradiol ve progesteron doğal dişi cinsiyet hormonları, testosteron doğal erkek cinsiyet hormonu, zeranol, trenbolon asetat ve melengestrol asetat ise sentetik büyüme artırıcı (hayvanların hızlı büyümesini sağlayan hormon benzeri kimyasal maddeler) maddelerdir. ABD federal yasaları bu hormonların koyun ve sığırların gelişimini hızlandırmak amacıyla kullanımına izin vermekte ancak, kanatlı (tavuk, hindi, ördek) ve domuzlarda kullanıma izin vermemektedir.

Ülkemizde de bu tür maddelerin kullanımı 1992 yılı itibari ile yasaklanmıştır. Bugün ülkemizdeki mevcut uygulama 2003 yılında çıkarılan “Gıda değeri olan hayvanlara uygulanması yasaklanan ve belli şartlara bağlanan hormon ve benzeri maddeler hakkında Tebliğ” (2003/18) ile düzenlenmektedir. Bu Tebliğe göre stilbenler, antitroidal maddeler, anabolizan amaçlı kullanılan steroidler, zeranol dahil beta rezorsilik asit laktonlar ve beta agonisti maddelerin anabolizan amacıyla kullanılmaları yasaktır. Aynı şekilde, bu tür maddelerin üretilmesi, satılması, bulundurulması ve uygulamaları da yasaktır. Ancak özellikle erkeklik ve dişilik hormonlarının tedavisel amaçla ve zootekni amacıyla kullanılmaları veteriner hekim kontrolünde ve reçete ile olmak üzere mümkündür. Ancak bu durumda da uygulama ile ilgili belirli kriterler söz konusudur. Bu türden ilaçlar implant şeklinde olamazlar; enjeksiyonluk, vaginal sünger ya da spiral tarzda olmaları gerekmektedir (Kaya ve Pirinçci, 2007).

2.1.2.1. Anabolik maddelerin sınıflandırılması

- Vücutta şekillenen doğal endojen hormonlar; testosteron, östradiol 17b, progesteron gibi maddelerdir.

Testosteron, dihidroependesteron (DHA) ve progesteron, vücutta hızla metabolize edildikleri için (testosteronun yarı ömrü 10-20 dk, progesteronun yarı ömrü 5-20 dk) ve dolayısıyla etki sürelerinin kısa olması nedeniyle anabolik amaçla kullanılmaları pratikte tercih edilmez.

- Anabolik steroidler; testosteronun türevi olup, bir kısmı anabolizan olarak kullanılır. Bunlar, 19-nortestosteron, 17- α alkiltestosteron, dihidrotestosteron ve androstenodion türevleri ile diğer türevler olarak sınıflandırılabilir.

Bu grupta yer alan anabolik steroidler özellikle kas içi enjeksiyonla verildiğinde, uygulama yerinden yavaş yavaş emilir, dolaşıma geçen ilaçtaki ester bağının kopmasıyla serbest kalır ve uzun süreli etki oluşturur.

- Yapay (sentetik nonsteroid) östrojenler; dietilstilbestrol (DES), hekzestol, dienestrol ve etinilstandrol gibi maddelerdir.

Genellikle bu tür maddeler enjeksiyon şeklinde verildiklerinde sindirim sisteminde tahrip olduklarından, etkileri çok azdır ya da verimi çok az artırır (Kaya, 1991; Liman, 1994; Şener, 1994).

2.1.3. Vitamin ve mineraller

Hayvan yemlerine az miktarda katılan vitamin A, As, Co, Cu gibi maddeler hayvanlarda gelişimin hızlanmasına ve yemden faydalanmanın artmasına neden olmaktadır.

2.1.4. Rumen sindirimi değiştiricileri

Geviş getiren hayvanların mideleri 4 bölümden oluşmaktadır. Bu bölümlerin en büyüğü rumen (ön mide) olup, bedenin sol tarafında bulunur ve karnın büyük kısmını oluşturur.

Geviş getiren hayvanlarda, bazı maddeler rumendeki bakteri topluluğunu etkileyip, sindirimi daha yüksek oranda propiyonik asidin oluşacağı şekilde değiştirerek, daha çok ATP hazırlanmasına neden olurlar. Buna karşılık, asetik asit ve butirik asit ile hidrojen şekillenmesi azalır; sonuçta, hidrojen ve karbondioksitin birleşerek metan şekillenmesi ve enerji kaybı önlenir. Böylece, hayvanların nişastalı-şekerli maddelerden oluşan enerjisi

daha yararlı bir şekilde kullanmaları sağlanır. Bu amaçla sıklıkla kullanılan maddelerden biri monensindir; ayrıca, lasalosid, narasin, avoparsin gibi maddeler de kullanılabilir.

2.1.5. Enzimler ve probiyotikler

Hayvan yemlerine katılarak ve besin maddelerinin sindirimini gerçekleştiren amilaz, lipaz, proteaz gibi enzimleri içeren prepatlar; bazı özel Lactobacilli ve Streptococci suşlarını içeren yem katkı maddeleri hayvanlarda yemin değerlendirilmesini artırır.

2.1.6. Nöroleptikler

Gelişimi hızlandırıcı etkileri, farmakolojik etkilerinin doğal bir sonucu olarak enerji harcanımını azaltmalarından kaynaklanmaktadır. Nöroleptiklerin bu amaçla kullanımı büyük ölçüde azalmıştır.

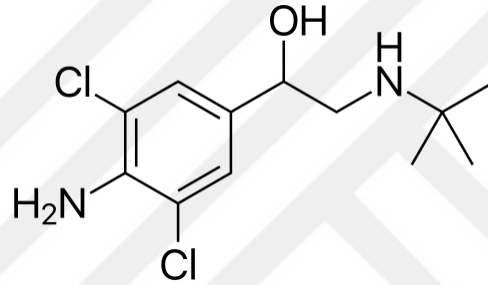
2.1.7. β_2 -adrenerjik reseptör uyarıcıları

Bu grupta yer alan klenbuterol, salbutamol, simaterol gibi maddeler yağ dokuda dağılan β_2 -adrenerjik reseptörlere (bu reseptörler bazen β_3 -olarak da adlandırılır) olan etkileri (yağların erimesine yol açıcı ve sentezini azaltıcı etkileri) nedeniyle, son yıllarda hayvanlarda gelişimi hızlandırıcı olarak kullanıma girmişlerdir. Birçok ülkede klenbuterolün gelişimi hızlandırıcı olarak kullanılması yasaklanmıştır (Kaya ve Pirinçi, 2007).

2.1.7.1. Klenbuterol

Anabolik steroidlerden olan klenbuterol oral yolla aktif olan β_2 -agonist bir ilaçtır. Tedavide, uterus kaslarının motilitesini durdurmak (tokolitik) ve bronkospazmolitik olarak kullanılmaktadır. Planipart® ve Ventipulmin® adlı ticari preparatları bulunmaktadır (Pfaffl vd., 2003).

Klenbuterol SSS stimulanı olarak kullanılan bir β_2 agonistidir. İnsanlarda bronkolitik (akciğerde nefes darlığından oluşan salgıların azaltılmasını sağlayan) ajan olarak astım tedavisinde, bronş ve uterus gevşetici (tokolitik) olarak da veteriner hekimlikte kullanılmaktadır. Klenbuterol anabolik etkisinden dolayı özellikle vücut geliştirici sporcular tarafından da kullanılmaktadır. Klenbuterol ilk kez 1972 yılında Kect ve ark. tarafından sentezlenmiştir. Kapalı formülü, $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O$; açık ismi, klen,4-amino-alfa(t-butil-amino)metil-3,5-diklorobenzil alkol'dür. Moleküler ağırlığı, 277,18 g'dır. Şekil 2.1'de klenbuterolün kimyasal yapısı gösterilmiştir. Beyaz renkli ve kokusuzdur. Ergime noktası $174\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' dir. Suda, metanolde ve etanolde iyi, kloroformda az çözünür, benzende ise çözünmez.



Şekil 2.1. Klenbuterol'ün yapısı

Klenbuterol azot tutucu, yağ depolamayı azaltıcı özelliğe sahiptir ve besin dönüşümünü etkiler. Anabolik etkisi protein sentezini artırmasının sonucudur. Hücre zarında β -reseptöründe bir dizi biyokimyasal tepkimenin başlatılmasından sorumludur. Klenbuterol'ün benzen halkasında -OH olmayışı lipofilikliğini artırır. Klenbuterol bu özelliğinden dolayı kan beyin bariyerini aşar ve santral sinir sistemine doğrudan etki yapar. Klenbuterolün alfa karbonu üzerindeki -OH substitüenti, ilacın monoaminoksidaza (MAO) karşı dayanıklılığını artırdığı için etki süresi uzundur. Azot üzerinde t-butil grubunun bulunması, β_2 -reseptörler üzerinde seçici etkinlik gösterir.

Klenbuterol'ün yarılanma ömrünün hayvanlarda 30 saat civarında olduğu, serbest olarak atıldığı ve terapötik doz uygulamasından sonra idrarla atılan miktarın hiçbir zaman 10-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ düzeyini aşmadığı görülmüştür (Poletini, 1996). Farelere propranolol, labetalol ve klenbuterol verildiğinde, bu ilaçların doğum öncesi ve sonrası serbest olarak beyinde biriktiği ve kan beyin bariyerini geçtiği bildirilmektedir (Botterblom vd., 1993).

Klenbuterol, hayvan kas ve dokularında birikerek, bu hayvanların etlerini yiyen insanlarda zehirlenmeye neden olmaktadır.

Klenbuterol'ün en belirgin yan etkileri; titreme, baş ağrısı, baş dönmesi, taşikardi, kusma, ateş, hipokalemi ve hipoglisemi gibi doz bağımlı laboratuvar değerleri anormallikleri, uzun dönem tedavilerde adale yorgunluğudur. Bunun yanında anabolik doz alımında β_2 -agonistlerin tüm yan etkilerini göstermektedir.

İnsan sağlığı açısından biyolojik örneklerde klenbuterolün hızlı ve hassas bir şekilde tespiti önem arz etmektedir. Tarım ve hayvancılıkta kullanılan bazı kimyasallar uygulandıkları yerlerde ve canlıların vücudunda kısmen parçalanarak etkisiz ya da zararsız hale getirilirken, bazıları (organik klorlu bileşikler, dioksinler, dibenzofuranlar, metaller, bazı mantar ilaçları, klenbuterol gibi) da oldukça yavaş ayrışmaları nedeniyle, artan miktarlarda birikirler; gıda zincirine giren bu maddeler, nihai tüketici durumundaki insanlara kadar ulaşırlar. İnsanlara ulaştıktan sonra ise hastalanmaya, hatta ölüme bile sebep olabilirler.

Klenbuterol tayin yöntemleri şöyledir;

- HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) (Botterblom vd., 1993; Chang vd., 2005; Morales-Trejo vd., 2013).
- GC-MS (Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi) (Amendola vd., 2002; Ramos vd., 2003).
- LC-MS (Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi) (Blanca vd., 2005; Courant vd., 2009; Dominguez-Romero vd., 2013).
- ELISA (Enzim bağlı immunosorbent test) (Prezelj vd., 2003).
- İki boyutlu sıvı kromatografisi (Guo vd., 2016).
- Elektrokimyasal immunosensör (Talib vd., 2016).
- Elektrokemilüminesans immunosensör (Li vd., 2013).
- İyon seçici elektrot (Liang vd., 2012).

2.2. Literatür Taraması

Guo P. ve ark., çalışmalarında; iki boyutlu sıvı kromatografisi ile moleküler baskılanmış monolitik kolona yeni bir yöntem kazandırmış ve domuz karaciğeri ve domuz idrar örneklerinde klenbuterol analizi gerçekleştirmişlerdir. Doğruluk, karaciğer ve idrarda sırasıyla, %94,3 ile % 99,7 ve % 93,7 ile % 99,6 arasında değişen değerlere sahipken, tekrarlanabilirlik bağıl standart sapmasını (RSD), her iki analiz için % 8,6'dan düşük elde etmişlerdir. Tayin sınırlarını ise karaciğer için 16 ng/mL, idrar için 25 ng/mL olarak tespit etmişlerdir (Guo vd., 2016).

Cao H. ve ark., bir hibridom kültür süpernatantından elde edilen klenbuterol (CL mAb) monoklonal antikoru, farklı polietilen glikol (PEG) konsantrasyonlarında, PEG molekül ağırlıklarında, pH değerlerinde ve NaCl konsantrasyonlarında sulu iki fazlı bir sistem (ATPS) ile saflaştırmışlardır. Daha sonra CL mAb, CL mAb'yi içeren bir PEG fazına doğrudan polistiren mikro küreler (PSMS'ler) ekleyerek yerinde immobilize etmişlerdir. Hareketsizleştirilmiş antikor kullanarak, domuz örneklerinde klenbuterol kalıntılarını tespit etmek için bir immünoensör kurmuşlardır. Sonuçları, pH 8,0'de % 15 (a/a) PEG6000, % 15 (a/a) fosfat ve % 15 (a/a) NaCl'den oluşan bir ATPS'nin kullanılmasıyla bölümlenme katsayısı 7,24, aktivite geri kazanımı % 87,86 ve saflaştırma katmanını 2,88 olarak elde etmişlerdir. PEG-CL mAb-PSMS 30 mL fosfat tamponu (PBS) ile yıkamaları yapıldıktan sonra ilk faaliyetinin % 98'ini muhafaza ettiğini tespit etmişlerdir (Cao vd., 2015).

Dou Y. ve ark., klenbuterol moleküllerinin hızlı ve yüksek hassasiyette algılanması için elektrik alan güdümlü ivme stratejisine dayalı akıllı telefon tabanlı bir immünoensör geliştirmişlerdir. İmmünoensör ilkesi, elektrot yüzeyindeki sınırlı anti-klenbuterol antikoları için örneklerdeki serbest klenbuterol (CL) ile CL-HRP konjugeleri arasındaki rekabet reaksiyonuna dayanmaktadır. CL monoklonal antikolarını, çok duvarlı karbon nanotüpleri ve keçi-anti-fare IgG'si (MWNTs-IgG) içeren nano-biyo katman üzerine monte etmiş ve kullanıma hazır immünoensör elektrotları oluşturmuşlardır. Optimal koşullar altında, immünoensörün, 6 dakika içinde en az 0,076 ng/mL CL tespit edebildiğini gözlemlemişlerdir (Dou vd., 2016).

Talib N.A.A. ve ark., klenbuterol tespiti için, PEDOT/MWCNT hibrit kompoziti tabanlı elektrokimyasal immunosensör geliştirmişlerdir. Poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT)'in yüksek iletkenlik özelliği ve karbon nanotüp (CNT)'ün yüksek yüzey alan özelliğinin kombinasyonu ile immunosensör elde etmişlerdir. Potasyum ferrisiyanid ($K_3[Fe(CN)_6]$)'daki siklik voltametri (CV) ölçümüne dayanarak, modifiye edilmemiş elektrotla (114,75 mV ve 0,163 mA) karşılaştırıldığında, daha düşük pik potansiyel ayrımı (90,33 mV) ve daha yüksek tepe akımı (0,197 mA) elde etmişlerdir (Talib vd., 2016).

Li C. ve ark., domuz idrarında az miktarda CL kalıntısı tayini için uygulanan, ultra-duyarlı bir elektrokemilüminesans immünosensör geliştirilmiştir. Antijen immobilizasyonu için altın nanopartikül katkılı kitosan kompozit film kullanılmış ve izleyici antikör olarak Ru (bpy) $_3^{2+}$ işaretli antikör kullanılmıştır. Önerilen yöntem doğrusal bir aralıkta 0,010-1,0 ng/mL'yi gösterirken, CL için de 0.0050 ng/mL'lik bir tayin limiti mevcut olup, önceki birçok raporunkinden düşük bir tayin limiti elde edilmiştir. Bu yöntem, basit manipülasyon, kısa tahlil süresi ve yüksek tespit hassasiyeti nedeniyle az miktarda CL kalıntısı taraması için uygun bulunmuştur (Li vd., 2013).

Liang R.N. ve ark., klenbuterol tayini için, bir polimerik membran iyon seçici elektrot hazırlamıştır. Kalıp molekül olarak, çökteltme polimerizasyonu ile sentezlenebilen, moleküler tanıma için bir iyonofor olan klenbuterol hidroklorür kullanılmıştır. Optimize edilmiş koşullar altında, önerilen membran elektrodu, $1,0 \times 10^{-7}$ M ile $1,0 \times 10^{-4}$ M konsantrasyon aralığında protonlanmış klenbuterolün tayin limiti $7,0 \times 10^{-8}$ M olarak elde edilmiştir. MIP tabanlı sensör mükemmel seçicilik, hızlı tepki süresi ve tatmin edici uzun vadeli istikrar gösterir. Potansiyometrik sensör, domuz idrar numunelerinde %98 ve %107 arasındaki geri kazanımlar ve 3 dakikadan kısa bir analiz süresi ile klenbuterol tayininde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Liang vd., 2012).

Özkütük E.B. ve ark., klenbuterol kalıntı tayini için, karbon nanotüpe dayalı klenbuterol baskılı polimeri, hem PVC hem de karbon pasta elektrot yapımında kullanmıştır. $1,0 \times 10^{-5}$ mM derişim içinde PVC membran elektrodun yaklaşık 2 dakikada, karbon pasta elektrodun ise yaklaşık 1 dakika gibi kısa bir sürede karara geldiği tespit edilmiştir. PVC membran elektrodun tayin limiti $4,9 \times 10^{-9}$ mM, karbon pasta elektrodun ise $9,1 \times 10^{-9}$ mM olarak belirlenmiştir (Özkütük vd., 2015).

Ig molekülünün kollarında bulunan hafif ve ağır zincir ile gövdesinde bulunan ağır zincirler birbirlerine disülfid bağları ile bağlıdır. Her polipeptit zincirinde olduğu gibi H ve L zincirlerinde de NH₂ ile sonlanan bir amino terminal uç ve COOH ile sonlanan bir karboksi terminal uç bulunmaktadır. Ig molekülünde Y harfinin iki kolunun uç kısımları amino terminal uçlar olup, antijenler bu kısımlara bağlanır. H ve L zincirlerinin amino terminal uca yakın olan kısımlarındaki aminoasitlerin diziliş sırası değişebilir özellikle olduğu için bu bölgelere V Bölgesi (Variable: Değişken) adı verilmektedir. Bu değişken kısımlar Ig molekülünün oluşumuna sebep olan antijen molekülüne uyacak özellikte sentezlenirler (Bilgehan, 1993). Eğer bir Ig, özellikle belirli bir antijeni kavrayacak şekilde üretilmişse, özgül bir antikordur ve genellikle hafif zincirleri sabittir (Aydın, 2000). Polipeptit zincirlerinin geri kalan kısımlarında değişkenlik görülmediğinden bu kısımlara C bölgesi (Constant: Değişmez) adı verilir.

Antikorlar, ağır ve hafif zincirlerden oluşan Fab (The fragment antigen binding: antijen bağlama kısmı) parçasından, antijenle spesifik bir şekilde birleşir. Antikorum antijen ile birleştiği bu bölge “**paratop**” olarak adlandırılır (Rhoades vd., 2000). Y şeklindeki molekülün tek parça halinde kalan ve birçok biyolojik aktiviteden sorumlu gövde kısmına ise soğukta kristalleşme özelliğine sahip olduğu için Fc (Fragment crystallizable: kristalize olabilen parça) adı verilmektedir. Fc parçasında sadece ağır zincirler bulunur ve sert bir moleküldür. Genellikle Ig tipine ve konağa ait olan bir uç ile sonlanmaktadır. Bu molekülün Fc parçası rijit olup antikor görevi görmez, bakteri hücrelerine veya antijene bağlanamaz. Fakat immün hücrelerin yüzeylerindeki reseptörlere bağlanabilir. Dolayısı ile bir antikor molekülü Fab parçaları ile antijeni tutar, Fc parçası ile immün hücrelere tutunur (Abbas vd., 1994; Aydın, 2000).

Antijen üzerinde antikor seçimliliğini yaratan özel bölgeler antijenik determinant veya “**epitop**” olarak adlandırılır. Bir antijen molekülünde birden fazla determinant grubu vardır. Antikorum paratop bölgesi 8-12 aminoasitlik determinant grubunu kavrayacak özelliğe sahiptir. Antijen ile antikor arasındaki bu bağlanma anahtar kilit ilişkisi şeklindedir (Abbas vd., 1994). Teoride antikorlar sınırsız sayıda antijenik determinant için hazırlanabilmektedir. Bazı antikorlar antijenin etkinliğine bağlı olarak antijenin farklı bölgelerine bağlanabilir ve bu antijen için farklı spesifikliğe sahip olarak üretilebilirler. Epitop spesifikliğinde farklılıklara sahip olan ve farklı alt sınıflara ait olan bu heterojen

antikorlar “**poliklonal antikor**” olarak adlandırılmaktadır. Aynı antijenin aynı epitopuna bağlanan, antijen için aynı ilgi ve spesifikliğe sahip antikorlara ise “**monoklonal antikorlar**” denilmektedir. Monoklonal antikorlar poliklonal antikorlardan daha yüksek spesifikliğe sahip olmalarına rağmen, antijene daha düşük ilgi gösterirler (Abbas vd., 1994; Madigan ve Martinko, 2010).

Orijinal kemirgen hibridoma yöntemine göre (Kohler ve Milstein, 1975), kemirgen B lenfositleri ile üretken olmayan fare myeloması birleştirilerek orijinal B lenfositlerinden monoklonal antikor üreten ölümsüz bir hücre serisi popülasyonu oluşturulmaktadır. İnsan B lenfositlerinin üretken olmayan fare myeloması ile birleştirilmesiyle (genellikle Epstein-Barr virüsü (EBV) kullanılarak transfer edilir) kemirgen-insan heterohibridomaları elde edilir ve bunlar doğal olarak insan monoklonal antikorlarını üretirler (Teng ve Lam, 1983). Hibridoma teknolojisinin ilk zamanlarında, monoklonal antikorlar genellikle in-vivo fare kültürleri ile elde edilmekteydi ve ilk lisanslı terapötik monoklonal antibadi (OKT3) bu yöntemle elde edilmiştir. Ancak, kalite, hayvan etikleri ve ölçek büyütme imkansızlıkları dikkate alınarak bu yöntem hızla tarihe karışmış ve yerini in-vitro hücre kültürüne bırakmıştır.

Monoklonal antikorlar geçmiş yıllarda sadece diagnostik test ajanları olarak ele alınırken, şimdi in-vivo teşhis (görüntüleme) ajanları olarak ve gerek doğrudan kendileri, gerekse de hedeflemeyi sağlayan kısım olarak toksinler, ilaçlar ve enzimlerle birlikte terapötik ajan olarak tıpta önemli bir role sahiptir. Monoklonal antikor molekülünün işlenmesi için tekniklerin geliştirilmesi ile antikorların antijenik seçiciliğe sahip parçacıklarının insan eşdeğerleriyle değiştirilmesi, özellikle terapötik ajan olarak monoklonal antikorların üretilmesinde önemlidir (Winter ve Milstein, 1991).

2.3.2. Antikor-antijen bağlanma özellikleri

Antijen-antikor birleşmesi özgüdür. Bir antijen sadece oluşumuna neden olduğu antikor ile birleşebilir. Antijen-antikor birleşmesi, antijen yüzeyindeki epitop ile antikor molekülünün Fab kısmının ucundaki V bölgesi arasında olur. Ag-Ab birleşmesinde çok kuvvetli olmayan, düşük enerjili bağlar rol oynar ve olay tersinir özelliktedir. Birleşme sonunda antijen veya antikor yapısında değişiklik veya parçalanma olmaz. Ag-Ab birleşmesi sırasında iki molekül birbirine ne kadar yakınsa ve bağlanma bölgeleri birbirine ne kadar

uygunluk gösteriyorsa; bağlanma o kadar güçlü olmaktadır (Anahtar-kilit modelinde olduğu gibi) (Luppa, 2001; D'Orazio, 2003).

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

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

Hidrojen bağları elektrostatik etkileşimlerin bir alt grubu olarak düşünülebilir. Hidrojen bağları, elektronegatifliği yüksek bir proton alıcı üzerindeki bağlanmamış bir çift elektron ile elektronegatifliği yüksek bir proton verici arasında meydana gelmektedir. Antikorlarda, amin grupları proton verici ve karbonil grupları, proton alıcı olarak görev yapmaktadır. Hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler bağlanmanın gücüne katkıda bulunurlar ve sulu çözümlerde bu etkileşimler, moleküller arası kararlılık için büyük bir katkıya sahiptir.

Van der Waals kuvvetleri ise, elektrostatik etkileşimlerden daha zayıf dipoller arasında meydana gelir. Yakın moleküllerin elektrik alanları bu kuvvetlerden sorumlu geçici dipollerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu etkileşimler kısmen zayıf olmasına rağmen, birçok etkileşimden meydana geldiği için toplam bağlanma şiddetinin %50'sini oluşturabilir. Antikor antijen arası uzaklık 1-2 Å'ında bu kuvvetler etkinleşir.

Hidrofobik etkileşimler, yüzeylerinde glisin, alanin, lösin, izolösin gibi hidrofobik aminoasit içeren iki protein arasında su moleküllerinin itilmesiyle oluşan bağlardır. Antikor antijen birleşmesinde en önemli rolü bu bağlar üstlenir.

Antikordaki dipoller antijenin dipolleriyle etkileşir ve bağlanma için uygun bir yönelmeyi sağlamak için ortak hareket ederler. Bu elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları moleküller arası kararlılık için birincil katkı sağlarken, diğer güçler tamamlayıcı olarak görev yapmaktadır (Martin, 2001).

2.3.3. Antijen-antikor bağlanma kinetiği

Çözeltide antikor ile antijen arasında gerçekleşen reaksiyon denklemi aşağıdaki gibidir. Ab, serbest antikor, Ag serbest antijeni, AbAg antijen-antikor kompleksini gösterir ve k_a ve k_d sırasıyla birleşme ve ayrışma sabitidir.



Ab-Ag arasında gelişen etkileşimlerin temel termodinamik prensibi ise eşitlikte verildiği gibidir.

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{Ab \times Ag}{[Ab] \times [Ag]} \quad (2.2)$$

İmmünoensörlerde kullanılan antikorlar ve antijenler tipik olarak katı bir yüzeye immobilize edilirler. İmmobilizasyon antikorum (ya da antijenin) yapısına göre değişebilmekte ve böylece bağlanma kinetiğini etkileyebilmektedir.

2.4. Nanopartiküller

Günümüzde, nanopartiküllerin farklı bileşimleri ve ölçüleri; birçok amaç doğrultusunda, hassas tayin yöntemleri olarak kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin sensör uygulamalarına getirdiği avantajlar; geliştirilmiş hassasiyet, artan yüzey alanları, güçlendirilmiş etkileri ve küçük boyutları şeklinde sıralanabilir (Wang, 2005).

Boyutları 100 nm ve altında olan nanopartiküller, nanoboyutlu malzemelerin ve dolayısıyla da nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır (Gürmen ve Ebin, 2008). Nanomateryaller son yıllarda, farklı yardımcı yapılar, kompozitler ve özellikle çeşitli sensörlerin üretilmesinde başarıyla kullanılmaktadır (Asefa vd., 2009).

Nanopartiküller farklı kimyasal yapıdaki materyallerden üretilirler. Bu materyallerden en çok kullanılanlar; metaller, metal oksitler, silikatlar, organik ve karbon materyaller ile biyomoleküllerdir. Morfolojik olarak ise nanopartiküller genellikle küre, silindir, tüp şeklinde olabilmektedir. Nanopartiküller spesifik uygulamalara uygun yüzey

modifikasyonlarının kolaylıkla gerçekleştirilebileceği şekilde dizayn edilebilirler (Temur, 2010).

Nanopartiküllerin en önemli avantajları, yüzey alanı hacim oranının yüksek olmasıdır. Nanopartiküllerle modifiye edilen elektrotlarda, nanopartiküller hem elektrodun yüzey alanını artırarak immobilizasyon verimini artırmakta hem de elektron aktarım hızını artırarak daha düşük tayin limitlerine inilebilmesine olanak sağlamaktadır. Oksit nanopartiküller genelde yüksek biyo uyuşabilirliklerinden dolayı biyomolekülleri immobilize etmek amacıyla kullanılırken, yarı iletken nanopartiküller elektrokimyasal analizlerde etiketleme ajanı olarak kullanılmaktadırlar (Luo vd., 2006).

Altın ve gümüş nanoparçacıklar literatüre bakıldığında en çok kullanılan nanoparçacıklardır. Gümüş nanoparçacıklara kıyasla altın nanoparçacıkların birçok avantajı vardır. Kolay hazırlanabilmesi ve yüksek homojenliğinin yanında altın nanoparçacıklar biyolojik moleküllere karşı (antijen, antikor veya DNA, RNA gibi) çok iyi bir biyouyumluluk gösterir. Bu nedenle altın nanoparçacıklar gen analizlerinde ve antijen-antikor tayininde sıklıkla kullanılmaktadır.

2.5. Sensörler

Sensörler fiziksel ortam ile endüstriyel amaçlı elektrik/elektronik cihazları birbirine bağlayan bir köprü görevi görmektedir. Bu cihazlar endüstriyel süreçte koruma ve görüntüleme gibi çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Günümüzde üretilmiş yüzlerce tip sensörden söz edilebilir. Mikro elektronik teknolojisindeki hızlı gelişmeler bu konuda her gün yeni buluş ya da yeni bir uygulama tipi geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Sensörlerin doğası, girdi miktarına yanıt olarak gelen sinyalleri üretmektir. Çıkış sinyali genellikle elektrikseldir. Sensörler algılama çeşitlerine göre; mekanik, termal, elektrikseldir, manyetik, optik ve kimyasal sensörler olmak üzere farklı gruplarda incelenebilir. Sensörün çalışma mekanizması Şekil 2.3'deki gibi şematize edilebilir.



Şekil 2.3. Bir sensörün çalışma mekanizması.

2.5.1. Kimyasal sensörler

Kimyasal sensörler, analiz edilen bileşene karşı spesifik bir numunenin konsantrasyonundan yararlanarak elde edilen kimyasal bilgiyi analitiksel olarak yararlı bir sinyale dönüştüren sistemlerdir (Güre, 2005).

Kimyasal sensörlerin bazı özellikleri şu şekildedir,

- i) Kimyasal sensörlerde; duyarlı bir tabaka analit ile kimyasal etkileşim içindedir.
- ii) Tek bir fiziksel ya da kimyasal özelliğin ölçülmesi gerekli değildir.
- iii) Minyatürize edilebilirler.
- iv) Analite maruz bırakıldıktan sonra, duyarlı tabakanın kimyasında bir değişiklik olmaktadır.
- v) Aynı kimyasal ölçümler için karşılık gelen eşdeğer aletlerden tipik olarak daha az masraflıdır.

Sensörler için en sık kullanılan sınıflandırma şekilleri ölçülen büyüklük ve kullanım alanlarına göre sınıflandırmadır.

Ölçülen büyüklüğe göre sınıflandırma;

- Mekanik
- Elektriksel
- Termal

- Manyetik
- Işıma
- Kimyasal (Stetter ve Penrose, 2002)

Kullanım alanlarına göre sınıflandırma;

➤ Kütle sensörler

Kütle sensörlere örnek olarak kuvars kristal mikrobalsans sensör verilebilir. Kuvars Kristal Mikrobalsans (Quartz Crystal Microbalance, QCM) farklı sensör uygulamalarında kullanılan, yüksek frekanslı, yüzeyindeki kütle değişimlerine hassas bir yöntemdir. Sensör yüzeylerine adsorbe edilmiş olan tabakaların neden olduğu rezonans frekansındaki değişimlerin (Δf) belirlenmesi temeline dayanır.

➤ Termal sensörler

Termal sensörler, görüntüleme yöntemi olarak gözle görülmeyen infrared ışın enerjisini (ısıyı) esas alan ve görüntünün genel yapısını infrared ışın enerjisine göre oluşmuş renkler ve şekillerin belirlediği görüntüleme sistemidir.

➤ Optik sensörler

Optik sensör, ışık ışınlarını elektronik sinyallere dönüştürür. Optik sensör ışığın fiziksel miktarını ölçer ve daha sonra bir araç tarafından okunabilen bir form haline çevirir. Optik sensör genellikle, bir ışık kaynağı, bir ölçme cihazı ve optik sensörü entegre eden daha geniş bir sistemin parçasıdır.

Optik sensörler; gaz sensörler, elektrooptik sensörler ve biyosensörler olmak üzere üç tiptir.

2.5.1.1. Biyosensörler

Biyosensörler; biyolojik analizlerde sıkça kullanılan bir çeşit kimyasal sensördür ve "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tarafından, kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar olarak tanımlanır. Biyosensörler, birçok sensör gibi reseptör ve iletici olmak üzere iki ana yapıdan oluşmaktadır. Eğer reseptör biyomoleküler bir yapıya sahipse biyoreseptör olarak adlandırılır.

Biyoreseptörler, biyosensör teknolojisinde spesifikliğin anahtarı olup, analitlerin ilgili kısımlarının sensöre bağlanmasından sorumludur. Başlıca biyoreseptörler; antikor-antijen, enzimler, nükleik asitler-DNA, hücresel yapılar-hücreler olmak üzere sınıflandırılır (Vo-Dihn ve Cullum 2000).

Biyosensörler, kullanılan biyoreseptör türüne göre, biyokatalitik esaslı ve biyoafinite esaslı olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilir. Biyokatalitik esaslı biyosensörler, sensör ortamında var olan makromoleküller (biyokatalizör) tarafından katalizlenen bir reaksiyon temeline dayanır. Yaygın olarak, enzim, hücre ve doku kesitleri kullanılır (Thevenot vd., 1999). Biyoafinite esaslı biyosensörler ise, biyosensörün biyolojik yapısında bulunan makromoleküller ile analitin etkileşmesi temeline dayanmaktadır.

Biyoafinite esaslı biyosensörlerde biyoreseptör olarak genellikle antikorlar/antijenler ve reseptör hücreler kullanılır. Biyoreseptör olarak, antijen/antikor çiftinin kullanıldığı biyosensörler "**immünosensör**" olarak adlandırmaktadır.

Antikor tabanlı biyosensörlerin en önemli avantajı immunojen olmalarıdır. Bu özellik sayesinde, hedefin saptama öncesinde saflaştırılmasına ihtiyaç duyulmamaktadır (Chambers vd., 2008).

İmmünosensörler, biyospesifik duyar element olarak immünoaktif maddelerin kullanıldığı bir biyosensör tipidir ve uygun antijen ile antikorun kompleks oluşumu esasına dayanmaktadır (Luppa vd., 2001).

Antijen ile antikor reaksiyonu oldukça spesifik bir reaksiyondur. Genellikle bağlanma ve afinite sabiti çok yüksek olduğu için, bu gibi sistemler tersinir değildir, ancak gerekli tampon çözeltilerin kullanılması sonucu kompleksin çözünmesi ile sistemin tekrar kullanımı sağlanabilmektedir (Thevenot vd., 1999).

Antijen ya da antikorların sensör yüzeyine immobilizasyonu ile üretilen immünosensörler, genellikle ölçüm prensibine göre sınıflandırılmaktadır. Elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik), optik, piezoelektrik ve termometrik duyar elementler immünosensörler için sensör platformu olarak kullanılmaktadır.

2.5.1.2. Elektrokimyasal sensörler

Çevirici olarak bir elektrokimyasal ölçüm sisteminin kullanıldığı kimyasal sensördür. Kimyasal sensörlerin çeşitlilik açısından en geniş grubunu içermektedir. Önemli özelliklerinden biri bu tip sensörlerin minyatürize edilebilmeleridir.

Elektrokimyasal sensörler ilk olarak, 1950'li yıllarda oksijen ölçümleri için kullanılmıştır. Son yıllarda, sınırlı alan uygulamalarında yanabilen gazlar ve toksik gazların kontrollerinde daha seçici ve yeni elektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir (Skoog vd., 1990).

Elektrokimyasal sensörlerin gelişmesindeki en önemli sebeplerden biri analite karşı iyi bir seçicilik sergilemesidir. Bu husus hem potansiyometrik sensörler hem de amperometrik sensörler için başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Her iki durumda da spesifik analitler için etkili sensörler geliştirilerek, ticari olarak üretilmiştir ve çeşitli numunelere uygulanmıştır (Stetter ve Penrose, 2002).

Ölçüm birimlerine göre sınıflandırması şu şekildedir;

a) Amperometrik Sensörler (Voltametrik Sensörler)

Amperometri genel anlamda, belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen

elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır ve ikinci elektrodun fonksiyonu referans elektrot olarak iş görür. Amperometrik sensörün temeli, elektrot yüzeyinde bir yükseltgenme/indirgenmeden dolayı akımın ölçülmesi ve elektrokimyasal hücrede bir potansiyelin uygulanmasıdır.

b) Kondüktometrik Sensörler

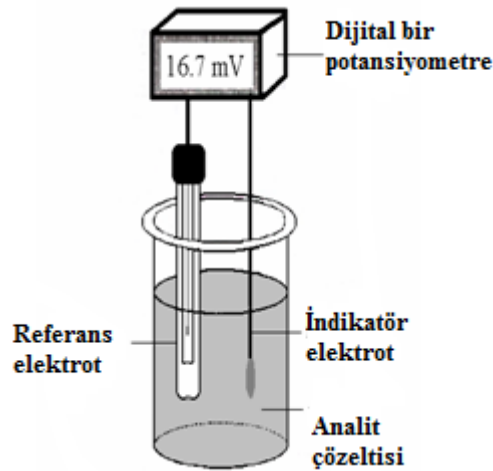
Elektrolitlerde iletkenlik ölçümüne dayalı olarak yapılan analiz yöntemine kondüktometri denir. Kondüktometrik sensörler, elektrolit çözeltilerin elektrik akımını iletmeleri üzerine kurulmuş metotlarla oluşturulan sensörlerdir. Kondüktometri iki elektrot arasındaki çözeltinin yük taşıma yeteneğini yansıtmaktadır.

c) Potansiyometrik sensörler

Akımın çok az geçtiği veya hiç geçmediği sistemlerde, indikatör elektrodun referans elektroda karşı gösterdiği, konsantrasyon değişimine bağlı olarak değişen potansiyelin ölçüldüğü elektrokimyasal tayin yöntemine potansiyometri denir (Covington, 1974). Bu metotta kullanılan sensörlere ise potansiyometrik sensör denir (Eren, 2006).

Potansiyometrik sistem; bir test hücresi (analit çözeltisi), buna bağlantılı olan indikatör elektrot (değişken potansiyel) ve referans elektrot (sabit potansiyel) ile kararlı bir potansiyometreden oluşur. Bunlara “**potansiyometrik hücre elemanları**” da denir. Analit çözeltisine daldırılan indikatör elektrotta mevcut iyon veya iyonların konsantrasyonuna bağlı olan bir potansiyel değişimi meydana gelir ve bu değişim iyonların konsantrasyonu ile ilişkili olduğu için konsantrasyonlarının tayinini yapmasını sağlar (Oliva vd., 2001).

Potansiyel ölçümlerinde genellikle potansiyometre ve pH metre kullanılmaktadır. Şekil 2.4’de potansiyometrik bir sistem görülmektedir.



Şekil 2.4. Potansiyometrik bir sistem

Potansiyometrik bir sistem 3 kısımdan oluşur:

- Referans elektrot
- İndikatör elektrot
- Potansiyel ölçme cihazı

2.5.1.3. Referans elektrotlar

Bir potansiyometrik hücrede kullanımı sırasında potansiyeli değişmeden kalabilen elektrotlara “**karşılaştırma elektrodu**” denir. Bu elektrotlara “**standart elektrotlar**” veya “**referans elektrotlar**” da denir. Elektrot potansiyeli tam olarak bilinen bir yarı hücredir ve referans elektrotların potansiyeli, üzerinde çalışma yapılan çözeltiliye bağlı değildir. Potansiyel, incelenen çözeltilide bulunan analitin veya diğer iyonların konsantrasyonundan etkilenmez. Fakat, sıcaklıkta meydana gelen değişimler referans elektrotların potansiyellerinde bir miktar değişmeye neden olmaktadır. Referans elektrot tersinir olmalı ve Nernst denkleminde uymalıdır. Bu elektrotlarda bulunan iç çözelti seviyelerinin ölçüm esnasında numune çözeltisinin seviyesinden daha yüksekte tutulması önerilmektedir. Çünkü numuneden gelen bazı iyonlar elektrot içerisine difüze olarak Ag^+ ya da Hg^{+2} iyonlarıyla çökelek oluşmasına neden olabilir. Bundan kaynaklanan hataların en aza indirilmesi için çift bölmeli referans elektrotların kullanılması önerilmektedir (Settle, 1997).

En yaygın kullanılan referans elektrotlar, kalomel elektrot ve Ag/AgCl elektrotlardır (Skoog, vd., 1998). Potansiyometrik ölçümlerde referans elektrot genellikle anot görevi görmektedir (Eren, 2006).

a) Kalomel elektrotlar

Kalomel elektrot kolay hazırlanabilmesi özelliği sebebiyle en sık kullanılan referans elektrottur. Kalomel referans elektrot, doymuş civa (I) klorür (kalomel) ile temasta olan civadan oluşur ve ayrıca bilinen derişimde potasyum klorür içerir. Kalomel yarı hücreleri aşağıdaki gibi gösterilebilir:

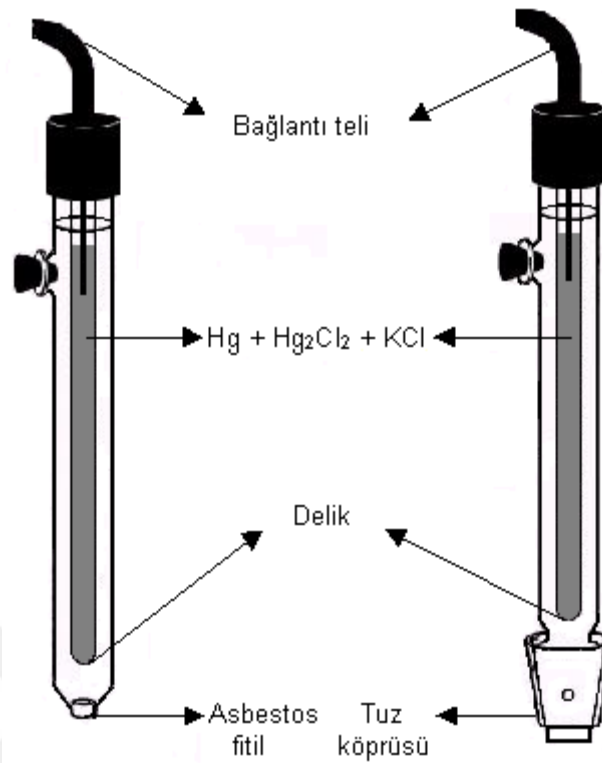


Burada x, çözeltideki KCl molar derişimini ifade eder. Bu yarı hücrenin elektrot potansiyeli,



reaksiyonu ile belirlenir ve x ile gösterilen klorür derişimine bağlıdır.

KCl yönünden doymuş iç referans çözeltisinin kullanıldığı kalomel elektrota, “**doymuş kalomel elektrot**” denir. Doymuş KCl çözeltisi kullanılmasının avantajı bir miktar sıvı buharlaşsa dahi klorür konsantrasyonunun değişmemesidir. Doymuş kalomel elektrot (DKE) kolay hazırlanması nedeniyle analitik kimyacılar tarafından yaygın olarak kullanılır ve 25°C’deki potansiyel değeri 0,2444 V’tur. Şekil 2.5’de kalomel elektrot görülmektedir.

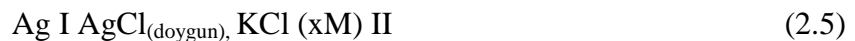


Şekil 2.5. Kalomel elektrot

Kalomel elektrodun dezavantajı, sıcaklıkla potansiyelinin değişim göstermesidir ancak bu durum yüksek sıcaklık (50°C 'nin üzerindeki sıcaklıklar) değişimlerinin görüldüğü hallerde önem kazanmaktadır. Bir diğer dezavantajı ise cıvanın toksik bir madde olmasıdır (Eren, 2006).

b) Ag/AgCl referans elektrot

Bir gümüş telin yüzeyinin elektrokaplama yoluyla AgCl ile kaplanmasıyla üretilir. Elektrot derişik KCl çözeltisine yerleştirildiğinde standart hidrojen elektroduna karşı 25°C sıcaklıkta 198 mV'luk bir potansiyel üretir. Üretilen potansiyel, Nernst eşitliği ile tanımlandığı gibi, çözeltinin klorür konsantrasyonu tarafından belirlenir. Klorür elektrot şematik olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir:



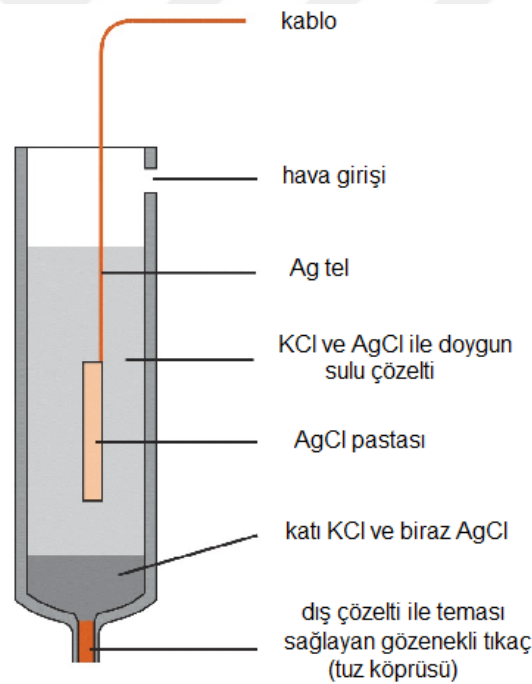
Elektrot potansiyeli;



reaksiyonu ile belirlenir.

$$E = E^\circ_{\text{AgCl/Ag}} - 0,0592 \log [\text{Cl}^-] \quad (2.7)$$

Klorür konsantrasyonu sabit kaldığı müddetçe elektrodun potansiyeli de sabit kalır. KCl bu elektrotta en çok kullanılan elektrolittir. Çünkü pH ölçümlerinde girişim yapmaz ve potasyum iyonu ile klorür iyonunun mobiliteyi neredeyse birbirine eşittir. Elektrodun hücre ile bağlantısını gözenekli bir tuz köprüsü sağlamaktadır. Tipik bir Ag/AgCl elektrot Şekil 2.6'de görülmektedir.



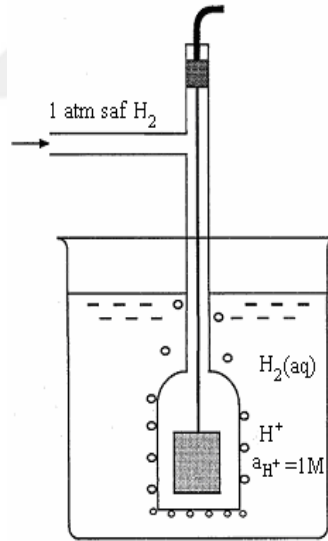
Şekil 2.6. Ag/AgCl elektrot

Ag/AgCl elektrot; basit, ucuz, kararlı olması ve 275 °K'lik sıcaklıkları bile kapsayan geniş bir sıcaklık aralığında kullanılabilmesi dolayısıyla en yaygın kullanılan referans elektrottur. Ayrıca çok küçük ebatlarda üretilebilmesi de toksik civa içeren kalomel elektroda karşı en önemli üstünlüklerinden biridir. Ancak, Ag/AgCl elektrotta

çözeltilerle temas eden tuz köprüsünün çözünmeyen gümüş kompleksleri ile tıkanma eğilimi en önemli dezavantajlardan birisidir (Harvey, 2000).

c) Referans hidrojen elektrot

Referans elektrotlar içinde en önemli olanıdır. Referans hidrojen elektrodu (SHE) daha çok hücre (pil) potansiyeli ve pH ölçümlerinde kullanılmaktadır. Diğer referans elektrotların potansiyelleri SHE'ye göre belirlenir ve bu durum potansiyellerin yanında belirtilir. Bu sebeple SHE “**primer referans elektrot**” olarak da adlandırılır. Diğer referans elektrotlara ise “**sekonder referans elektrotlar**” denir. Standart hidrojen elektrot, hazırlanışının ve çalıştırılmasının güç olması, elektrodun yükseltgen ve indirgen maddelere karşı duyarlı olması ve elektrotta kullanılan platin yüzeyinin bazı maddelerden zehirlenmesi nedenleriyle nadir durumlarda kullanılmaktadır. Şekil 2.7’de bir referans hidrojen elektrot gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Referans hidrojen elektrot

2.5.1.4. İndikatör elektrotlar

Potansiyometrik bir hücrede referans elektrotla birlikte kullanılan, tayini yapılacak iyonun aktivitesinde meydana gelen değişimi ölçen elektrotlara “**indikatör elektrotlar**” denir. Bir indikatör elektrot, analizi yapılacak iyonun aktivitesindeki değişimlere çok kısa

sürede cevap vermektedir. Bu tür elektrotlar belirli bir iyonla karşı seçicilik göstermesine rağmen diğer iyonlara karşı da tamamen duyarsız değildir. İndikatör elektrotlar; metalik indikatör elektrotlar ve iyon seçici (membran indikatör) elektrotlar olarak iki grupta incelenmektedir.

a) Metalik indikatör elektrotlar

Tersinir olarak yükseltgenerek iyonlarını oluşturan Ag, Cu, Cd, Hg ve Pb elektrotları kendi iyonlarının tayininde kullanılabilir. Ayrıca bunlar iyonları ile çözünmeyen tuz oluşturan anyonların tayin edilmesinde de uygulanabilir.

Bir çözeltide iki ayrı oksidasyon basamağında bulunan bir iyonun iki ayrı değerliğinin konsantrasyon oranını izlemek için Pt, Pd, Au, Ir gibi inert elektrotlar kullanılır.

b) İyon seçici (membran indikatör) elektrotlar

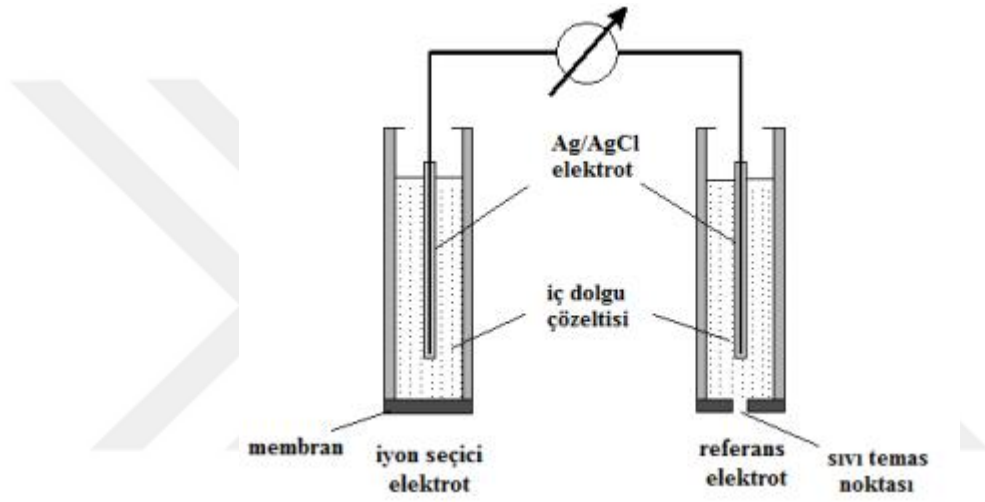
Membran elektrotların gelişmesi cam elektrotların kullanılmasıyla başlamıştır. Cam elektrotta, iki asit çözeltisi bir cam membranla ayrılır ve çözeltideki diğer bileşiklerin cinsine bağlı olmaksızın yalnız bu iki çözeltideki hidrojen iyonları konsantrasyonuna bağlı olan bir potansiyel elde edilir. Cam membranın hidrojen iyonlarına karşı olan duyarlılığının mekanizması incelenip, Na⁺, K⁺, Li⁺, F⁻ gibi diğer iyonlara karşı duyarlılıkları olan membranlar kullanarak uygulanmıştır. Böylece bu iyonların elektrokimyasal yöntemle direkt tayinlerine olanak veren elektrotlar geliştirilmiştir.

Bir metalik elektrodun potansiyeli, elektrot yüzeyinde oluşan bir yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonu eğilimi nedeniyle artarken, membran elektrotlarda gözlenen potansiyel, analit çözeltisini referans çözeltiden ayıran bir membran boyunca gelişen bir temas potansiyelinden kaynaklanmaktadır.

Çok sayıda anyon ve katyonun doğrudan potansiyometrik ölçümlerle hızlı ve seçici tayinine imkân veren çeşitli ticari membran elektrotlar bulunmaktadır. Bu tür düzeneklerin

çoğunun yüksek seçicilikleri nedeniyle membran elektrotlar çoğunlukla iyon seçici elektrotlar olarak da adlandırılır.

İyon seçici elektrotlar en uzun geçmişe sahip kimyasal sensörlerdir. ISE alanı temel membran bilimi ile temel kimya arasında bir köprü oluşturur (Wang, 2006). Potansiyometrik sinyal veren, elektrokimyasal sensör sınıfının en önemlilerinden biri, iyon seçici elektrotlardır. Şekil 2.8 iyon seçici elektrot kullanılarak oluşturulan potansiyometrik bir hücre şemasıdır.



Şekil 2.8. İyon seçici elektrot kullanılarak oluşturulan potansiyometrik hücrenin şeması

İyonlara duyarlı membran indikatör elektrotlar, genellikle, iyon seçici veya p-iyon elektrotlar olarak adlandırılır. p-iyon terimi bu elektrotlardan elde edilen verilerin genellikle rapor edilme tarzına (örneğin, pH, pCo veya pNO_3^- gibi) dayanmaktadır.

Bir numunedeki iyon karışımları içerisinde tercihen tek bir iyonla karşı cevap verebilen elektrotlara “**iyon seçici elektrotlar (ISE)**” denir. Diğer elektrotlar sadece tek bir iyon çeşidine karşı cevap sergilemez ve diğer iyonlara karşı da az miktarda seçici davranır. İyon-seçici elektrotlar ise genel olarak bir iyonla karşı belirli bir seçicilik göstermektedir.

Potansiyometrik iyon-seçici elektrotları oluşturan membranlarda bulunması istenen bazı özellikler vardır. Bunlar;

- Sadece analit iyonu seçici davranmalı,
- Analit çözeltisi içinde çözünmemeli ya da çözünmesi ihmal edilebilecek seviyede olmalı,
- Membranın bir yüzeyi ile diğeri arasında bir miktar iletkenlik göstermelidir.

İyon seçici elektrotlarda bir iyonu bağılı membran potansiyelinin oluşabilmesi için elektrodun membran yüzeyinin her iki tarafında bir iyon değişim dengesinin mevcut olması gerekmektedir. Bu potansiyelin ölçümü için membrandan çok küçük bir elektrik akımının geçmesi gerekir. Bu akım, elektrodun seçici olduğu iyonun elektrot membranı ile çözelti ara yüzeyindeki hareketi ile sağlanır.

Potansiyometrik sensörlerde, çözeltideki yüklü türler ile seçici bileşenlerin kimyasal etkileşimleri sonucunda bir indikatör elektrot, referans elektroda göre elektrokimyasal bir potansiyel gösterir. Potansiyometrik indikatör elektrodun seçici bileşeni bir iyon seçici membran olabilir. İyonofor bazlı ISE membranları genellikle, plastikleştirilmiş bir polimerik faz (PVC gibi), lipofilik iyon değiştirici bölgeler ve bir lipofilik veya kovalent olarak hareketsiz kılınmış iyonofor içerir.

Potansiyometrik bir hücrede iyon-seçici elektrotlar indikatör elektrot olarak kullanılır. İdeal bir indikatör elektrot, çözeltideki tek bir iyonun veya iyon grubunun konsantrasyonundaki değişimlere hızlı ve tekrarlanabilir olarak cevap verir. İyon taşıyıcılı polimerik membran esaslı iyon-seçici elektrotlar, 1960'ların sonlarından bu yana, belirli iyonlar için yüksek seçiciliğe sahip birçok iyon-taşıyıcı, hazırlama kolaylığı, hızlı ölçüm, daha iyi seçicilik, geniş konsantrasyon aralığı ve düşük maliyet gibi birçok avantaj sunmakta ve çeşitli çevresel örneklerde farklı iyonik türlerin tayininde kullanılmaktadır (Bühlmann vd., 1998; Yu vd., 2007; Mahajan vd., 2009).

İyon seçici elektrotlar iki gruba ayrılırlar.

a) Kristalin membran elektrotlar: Homojen ve heterojen olmak üzere iki tip kristal membran elektrot geliştirilmiştir. Heterojen kristalin membran elektrotlar, ince toz halinde katı maddelerin polivinilklorür, parafin veya silikon kauçuk gibi inert bir madde içinde dağılması ile hazırlanmaktadır. Membranlar, bu katı maddeyi oluşturan iyonlardan birine

karşı seçici davranmaktadır. Homojen membranlar, en önemli tip kristal membranlardır. İyonik bir bileşikten veya iyonik bileşiklerin homojen bir karışımından hazırlanmışlardır. Oluşturulan bu membranlar teflon veya polivinilklorür gibi inert bir maddeden yapılan bir tüpün ucuna tutturularak elektrot oluşturulur. Bu tip elektrotlarda membran;

- Tek kristalli olanlar:

Örnek: F⁻ iyonu tayin etmede kullanılan LaF₃ tek kristali.

- Çok kristalli veya karışık kristalli olanlar:

Örnek: S²⁻ ve Ag⁺ iyonlarını tayin etmede kullanılan Ag₂S kristali şeklinde sınıflandırılabilir.

b) Kristal olmayan membranlar:

- Cam membran elektrotlar (Na⁺ ve H⁺ için silikat camlar)
- Sıvı membran elektrotlar (Ca²⁺ için sıvı iyon değiştiriciler ve K⁺ için iyonoforlar)
- Bir polimerin gözenğinde tutturulmuş iyon değiştirici sıvılardan oluşturulan elektrotlar (Ca²⁺ ve NO₃⁻ için polivinilklorür matrisi) bu tip elektrotlara örnektir.

2.5.1.5. İyon seçici membranların özellikleri

Bazı katyon ve anyonlara karşı membranların duyarlı ve seçici olmasıyla ilgili olarak iyon-seçici membranların çeşitli ortak özellikleri Buck (1974) tarafından özetlenmiştir. Bu özellikler şu şekildedir;

- a) *Minimum çözünürlük:* İyon seçici ortam için gerekli olan özelliklerden biri, iyon seçici membranların analit çözeltilerindeki (genellikle sulu çözeltiler) çözünürlüklerinin sıfıra yaklaşmasıdır. Bu sebeple membranların çoğu, silika camlar veya polimerik reçineler gibi büyük moleküllerden oluşmaktadır. Gümüş halojenürler gibi çözünürlüğü az olan, iyonik anorganik bileşiklerden de membranlar hazırlanabilir (Skoog, vd., 1998). Uygun materyaller anorganik çözücülerde neredeyse hiç çözünmemeli, ancak bu çözücülerini belirli bir dereceye kadar absorplayabilmelidir. Membran fazı ile çözelti arasındaki ara

fazda gerçekleşen iyon değişimi prosesinin hızlı ve geri dönüşümlü olması gerekir (Morf, 1981).

- b) *Elektriksel iletkenlik*: Bir membran az da olsa bir elektriksel iletkenliğe sahip olmalıdır. Bu iletkenlik genellikle, tek yüklü iyonların membran içinden göçü yoluyla meydana gelmektedir (Kaplan, 2007).
- c) *Tayin edilecek türe karşı seçicilik*: Bir membran ya da membran matriksinde bulunan bazı türlerin, analite seçici olarak bağlanma yetenekleri olmalıdır. Bu bağlanma; iyon değişimi, kristallenme ve kompleksleşme olmak üzere üç şekilde gerçekleşmektedir (Skoog ve Holler, 1998).

2.5.1.6. İyon seçici elektrotların performansını belirleyen faktörler

Seçicilik: Bir numune içerisinde uygun bir ölçümün yapılıp yapılamayacağıın ölçüsü olan seçicilik, elektrodun en önemli karakteristik özelliklerinden biridir. Bir iyon seçici elektrot spesifik bir iyonla cevap verirken çözeltilde bulunan diğer iyonlara da cevap verebilir. Diğer iyonun fiziksel ve kimyasal olarak incelenen iyonla benzemesi durumunda bu cevap özellikle söz konusudur. Böyle bir durumda elektrodun, bozucu etki yapan iyon varlığında primer iyon adı verilen asıl tayin edilen iyonla karşı duyarlılığının nasıl olduğu bilinmelidir. Elektrodun tersinir olarak cevap verdiği iyonlardan başka türleri de içeren bir deney çözeltilisinde elektriksel potansiyel, membranın diğer türlere olan seçiciliğine bağlı olarak değişmektedir (Kaplan, 2007). Bir iyon seçici elektrot için en üst seçicilik sınırı, yalnızca analit iyonla karşı seçicilik gösterdiği zaman elde edilir. Ancak çoğu analit için böyle ideal bir membran elde edilememektedir.

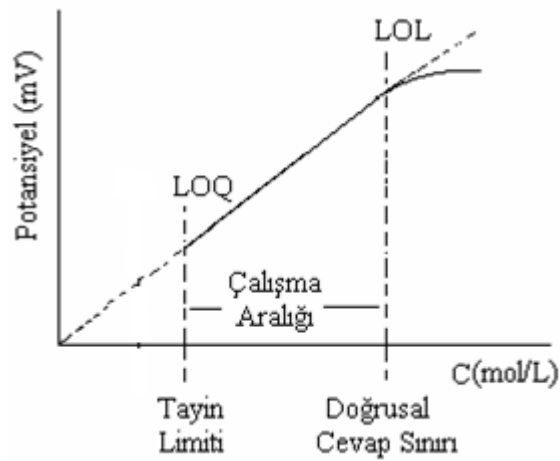
Duyarlılık: Birim aktivite başına sinyaldeki değişim olarak tanımlanmaktadır. Bir kalibrasyon eğrisinin doğrusal kısmının eğimi o elektrodun duyarlılığını verir. Geleneksel İSE'ler Nernst eşitliğine göre cevap vermektedir. Analit iyonun yükünün (z_i) artmasıyla elektrot duyarlılığı ciddi bir şekilde düşer. Tek yüklü bir iyonun her bir 10 kat aktivite değişimi için 59 mV civarında bir EMK değişimi gözlenirken çift yüklü bir iyon için bunun yarısı beklenir. İyon-seçici elektrotların bilinen kullanımında, numune ile iyon seçici elektrot membranının faz temas yerindeki analit iyonlarının dengeli bir şekilde

paylaşılması etkilidir. $a_i(\text{org})$ büyüklüğünün numuneden bağımsız olması nedeniyle ortaya çıkan cevaplar Nernst eşitliğine uygundur (Amemiya vd., 1998).

$$E_s = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_i(\text{suda})}{a_i(\text{org})} \quad (2.8)$$

Doğrusal Çalışma Aralığı: IUPAC'a göre bir hücrede, elektrotların potansiyel cevaplarının analit çözeltisinin eksi logaritmasına karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğrinin doğrusal kısmı doğrusal çalışma aralığını ifade eder. Bir iyon seçici elektrodun doğrusal çalışma aralığının mümkün olduğunca geniş konsantrasyon aralığında olması istenmektedir. Doğrusal çalışma aralığının düşük derişimlerden başlaması elektrodun kullanım alanını genişletmekte ve anyon ya da katyonların düşük derişimlerde ölçümünü mümkün kılmaktadır. Tipik olarak, ISE kalibrasyon eğrilerinde 10^{-1} - 10^{-5} M aralığında doğrusal bir cevap gözlenirken son yıllarda yapılan çalışmalar, bu doğrusal aralığı daha düşük derişim bölgesine doğru götürmek amacındadır (Kaplan, 2007).

Doğrusal çalışma aralığı, tayin edilebilen en küçük analit derişiminden (LOQ) kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği (LOL) derişime kadar olan aralıktır. Doğrusal çalışma aralığı Şekil 2.9'de gösterilmiştir.



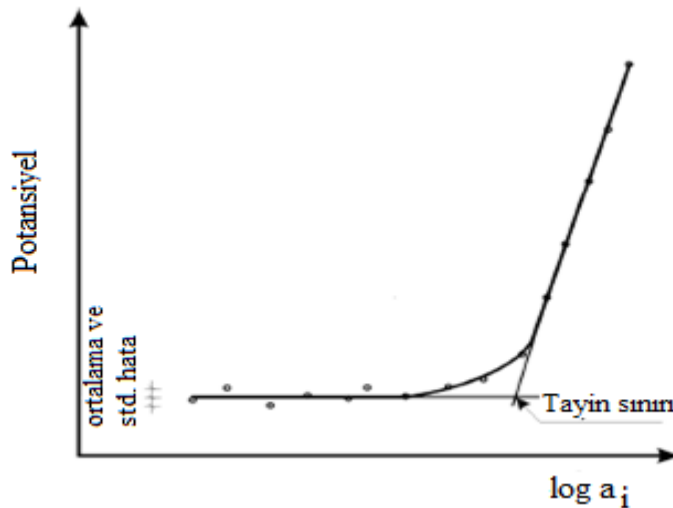
Şekil 2.9. Doğrusal çalışma aralığı

Tayin sınırı: Belirli bir güven seviyesinde tayin edilebilen en küçük analit derişimi veya kütlesi tayin limiti (gözlenebilme sınırı) olarak adlandırılır. İyon seçici elektrotlar için tayin

limiti, membran ara fazında ölçülebilir bir potansiyel farkı meydana getiren en düşük iyon konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır.

IUPAC'a göre (IUPAC, 1994, 2000); genellikle tayin limiti, tek yüklü anyon ve katyonlara duyarlı elektrotlarda, elektrodun sabit potansiyel sergilediği potansiyel değerinden ± 18 mV farklılık gösterdiği potansiyel değerine karşılık gelen madde miktarı olarak alınır. Bu potansiyel farkı çift yüklü anyon ve katyonlar için ± 9 mV, üç yüklü iyonlar için ise ± 6 mV olarak kabul edilmiştir. Çoğu iyon seçici elektrot için tayin limiti 10^{-5} M civarında iken bazılarında ise bu değer 10^{-7} M'a kadar düşebildiği görülür. Bu limitler, ortamda bulunan girişim yapan iyonlar ve moleküller ile ters yönde etkilenebilir (derişik sulu çözeltilerde su molekülleri iyonların hidrofobik membrana girişini önler ve tayin limiti ters yönde etkilenir).

İyon seçici bir elektrodun kalibrasyon grafiği genel olarak Şekil 2.10'deki gibidir. Şekilde görüldüğü gibi kalibrasyon grafiği iki doğrusal kısımdan oluşur. Pratik kullanımlara uygunluk açısından; durgun ortam ölçümlerinde elektrotların tayin limitleri, bu iki doğrusal bölgenin ekstrapolasyonlarının kesiştiği noktaya karşılık gelen aktivite değeri olarak verilmektedir (Buck ve Lindner, 1994).

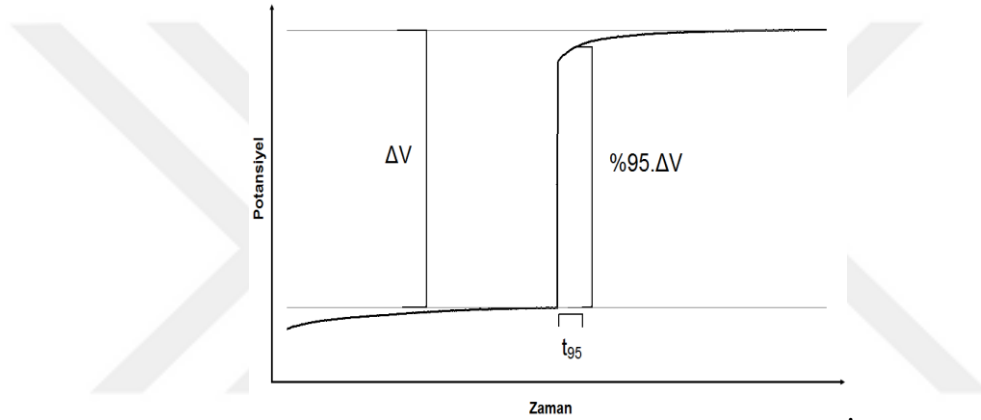


Şekil 2.10. İyon-Seçici elektrotların tayin sınırlarının belirlenmesini gösteren grafik

İyonofor bazlı ISE'lerin tayin sınırlarının düşürülmesinde son zamanlarda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Temel iyonun tayin sınırlarını geliştirmek için iç dolgu çözeltileri,

bozucu iyonun oldukça yüksek bir derişimine ve temel iyonun düşük (nerdeyse 0) derişimine sahip olmalı veya inert bir iç dolgu çözeltisi (CaCl_2 gibi) kullanılmalıdır (Sokalski vd., 1999).

Cevap süresi: Temelde elektrodun fiziksel yapısıyla ilgili bir özellik olan cevap zamanı genel olarak membranın duyarlı kısmıyla çözeltideki iyon arasında bir dengenin kurulabilmesi için geçen süre olarak bilinir. IUPAC'a göre ise, dengenin kurulabilmesi için geçen sürenin %95'i olarak belirtilip t_{95} şeklinde gösterilir (Buck ve Lindner, 1994). Şekil 2.11'de IUPAC'a göre cevap zamanı grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.11. IUPAC'a göre cevap zamanı (t_{95})

Girişim yapan türler, bir Nernst cevabı oluşması için ana iyonların taşınmasını geciktirir ve cevap zamanını etkiler. Elektrotların cevap süreleri aşağıdaki işlemlerle kısaltılabilir;

- Etkili karıştırma (veya akış hızının artırılması)
- Membran yüzeyinden kirliliklerin uzaklaştırılması ya da çok küçük membran yüzeyli mikroelektrotlar kullanılması
- Ölçüm sırasında çözelti konsantrasyonunun düşükten yükseğe doğru olması.

Ömür: ISE için en önemli karakteristik özelliklerden biri kullanım ömrüdür. Elektrotların kullanım ömürleri Nernst cevabı sergiledikleri süre olarak bilinmektedir (Erdem vd., 2000).

Elektrotların kullanım ömürleri on katlık konsantrasyon değişiminde belirli periyotlarla sergiledikleri potansiyel farkların incelenmesi ile belirlenir. Bu potansiyel farklar kullanılarak zamana karşı grafikler oluşturulur. Eğitimde önemli bir farkın meydana geldiği süre, kullanım ömrü olarak verilebilir (Ngeontaea vd., 2008).

pH çalışma aralığı: Elektrotların pH çalışma aralıkları araştırılırken genellikle elektrodun seçici olduğu ana iyonun 10^{-1} M, 10^{-2} M veya 10^{-3} M derişimini içeren tampon çözeltiler kullanılır. Tampon çözeltilerin pH'sı genelde 2-9 arasında değişmektedir. Bu çözeltilerin potansiyelleri ölçülür ve pH'a karşı grafiğe geçirilir. Potansiyelde önemli bir değişmenin meydana gelmediği pH aralığı elektrodun pH çalışma aralığı olarak alınır.

Tekrarlanabilirlik: Hazırlanan iyon seçici elektrotların tekrarlanabilir potansiyeller vermesi, analiz işlemlerinde hataların en aza indirilebilmesi ve analizin güvenilirliği yönlerinden istenilen bir özelliktir. Tekrarlanabilirlik, standart çözeltilerde okunan bir seri potansiyel değerinin standart sapması olarak verilmektedir (Buck ve Lindner, 1994).

2.5.1.7. İyon seçici elektrotların seçicilik yöntemleri

İyon seçici elektrotların seçicilik sabitleri, iki sınıfa ayrılan; karışık (mixed) çözelti metotları ve ayrı çözelti metotları olmak üzere farklı yöntemlerle hesaplanabilir. Bunlardan en sık kullanılan metot ise, 1975 yılında IUPAC tarafından önerilen ve bir karışık (mixed) çözelti metodu olan sabit girişim metodudur (Umezawa vd., 2000).

a) Karışık (mixed) çözelti metotları

Bu metotlar dört ana gruptan oluşmaktadır:

1) Sabit girişim metodunda; ISE ve referans elektrottan oluşan hücrenin potansiyeli girişim yapan iyonun aktivitesinin (aB) sabit tutulduğu fakat ana iyon aktivitesinin (aA) değiştirildiği çözeltiler yardımıyla ölçülür. Elde edilen potansiyel değerleri ana iyonun aktivitesine karşı grafiğe geçirilir. Bu grafiğin ekstrapole edilmiş doğrusal kısmının

aktivite eksenini kestiği nokta aşağıdaki eşitlikten seçicilik sabitinin hesaplanmasında kullanılan ana iyonun aktivitesini verir.

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

2) İki çözelti metodu; saf ana iyon çözeltisinin potansiyeli (E_A) ile ana iyon ve girişim yapan iyonun karışımından oluşan çözeltinin potansiyelinin (E_{A+B}) ölçümünü kapsar. Seçicilik sabiti potansiyel farkı değerinin ($\Delta E = E_{A+B} - E_A$) aşağıdaki eşitlikte yerine yazılmasıyla hesaplanır.

$$k_{A,B}^{pot.} = a_A [e^{\Delta E Z_A F / (RT)} - 1] / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.10)$$

3) Sabit ana iyon metodunda; ISE ve referans elektrottan oluşan hücrenin potansiyeli ana iyonun aktivitesinin (a_A) sabit tutulduğu fakat girişim yapan iyonun aktivitesinin (a_B) değiştirildiği çözeltiler kullanılarak ölçülür. Elde edilen potansiyel değerleri girişim yapan iyonun aktivitesine karşı grafiğe geçirilir. Bu grafiğin ekstrapole edilmiş doğrusal kısmının keşişimi aşağıdaki eşitlikten seçicilik sabitinin hesaplanmasında kullanılan girişim yapan iyonun aktivitesini verir.

$$k_{A,B}^{pot.} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.11)$$

4) Potansiyel eşitleme metodu; potansiyometrik seçicilik sabitleri aynı koşullar altında aynı potansiyel değişimini veren ana iyon ve girişim yapan iyonun aktiviteleri oranı olarak tanımlanır. İlk olarak, ana iyonun bilinen aktivitedeki (a_A') bir çözeltisi ana iyonun aktivitesinin (a_A) önceden ayarlanmış olduğu referans çözeltiliye ilave edilir ve potansiyel değişimi kaydedilir. Daha sonra, girişim yapan iyonun çözeltisi (a_B) aynı potansiyel değişimi kaydedilene kadar referans çözeltilisine ilave edilir. Bu yöntemde seçicilik sabiti aşağıdaki eşitlikten hesaplanır (Umezawa vd., 2000).

$$k_{A,B}^{pot.} = (a_A' - a_A) / a_B \quad (2.12)$$

b) Ayrı çözelti metotları

Ayrı çözelti metoduyla seçicilik sabiti hesaplaması iki farklı biçimde yapılabilir. ISE ve referans elektrottan oluşan hücrenin potansiyeli iki ayrı çözeltiyle ölçülür. Bu çözeltilerin birincisinde a_A aktivitede A iyonu bulunurken hiç B iyonu bulunmaz. Bu çözeltinin ölçülen potansiyeli E_A 'dır. İkinci çözeltide ise ilk çözeltideki iyonunun aktivitesine esit aktivitede B iyonu (a_B) bulunurken A iyonundan hiç bulunmaz. Bu çözeltinin ölçülen potansiyeli E_B 'dir. Bu veriler kullanılarak bu yöntemle göre seçicilik sabitleri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanır. Bu yöntemde $a_A=a_B$ durumu dikkate alınır.

$$\log k_{A,B}^{pot.} = \frac{(E_B - E_A)Z_A F}{RT \ln 10} + (1 - Z_A/Z_B) \log a_A \quad (2.13)$$

ISE'lerdeki $\log a$ ve E arasındaki ilişki ana iyon ve girişim yapan iyon için elde edilir. Bu ilişki yardımıyla aynı potansiyel değişime neden olan aktiviteler hesaplanarak aşağıdaki eşitlik yardımıyla seçicilik sabitleri belirlenir. Bu yöntemde $E_A=E_B$ durumu dikkate alınır (Umezawa vd., 2000).

$$\log k_{A,B}^{pot.} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.14)$$

2.5.1.8. İyon seçici elektrotların avantaj ve dezavantajları

İyon seçici elektrotların avantaj ve dezavantajları şunlardır:

İyon seçici elektrotların avantajları

- Elektrotlar, birçok kimyasal tür için geniş bir derişim aralığında doğrusal olarak değişim göstermektedirler.
- Bilinmeyen numunenin bozunmasına neden olmaz, sadece numuneyi ihmal edilebilir ölçüde kirletirler.
- Spektrofotometrik ölçümlere uygun olmayan, koyu renkli ve bulanık çözeltiler elektrotlarla kolaylıkla ölçülebilir.

- Elektrotlar, kromatografik ve akış enjeksiyon analiz yöntemlerinde dedektör olarak kullanılabilirler.
- Elektrotların cevap süreleri genellikle kısadır (saniye ve dakika seviyelerinde). Bu nedenle klinik ve endüstriyel numunelerin tayininde kullanılırlar.
- Hem pozitif hem de negatif iyon derişimini ölçebilirler.
- Özel olarak hazırlanan elektrotlar ile değişik yollarla ulaşılamayan zor ortamlarda (canlı hücrelerin içi gibi) ölçüm yapılabilir.
- Hazırlanması, kullanılması kolay ve ekonomiktir. Tamamıyla katı hal kontakt ve jel dolgulu modelleri sağlam ve kararlıdır.

İyon-seçici elektrotların dezavantajları

- Elektrotları hazırlarken ve elektrotlarla çalışırken olumlu sonuç elde edebilmek için çok dikkatli olmak gerekmektedir
- Bazı iyonik türler girişim yapar ya da elektrotları zehirler.
- Elektrotlar, proteinler ve diğer organik maddeler vasıtasıyla kirlenir ve bu kirlenme potansiyellerin kararsız olmasına ve kaymasına yol açabilir.
- Elektrotlar kompleks halinde olmayan iyonlara cevap verirler. Bu nedenle iyon seçici elektrotlarla yapılan ölçümler, ortamda ligand bulunmamasını, varsa da varolan ligandların maskelenmesini gerektirir.
- Analiz işlemlerinin doğruluğu açısından ölçümler sırasında ortamın iyonik şiddetinin sabit tutulması gerekir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Asetik asit (CH_3COOH) ve metanol (CH_3OH) Merck'ten, potasyum klorür (KCl) Fluka'dan temin edilmiştir. Monoklonal anti-klenbuterol antibadi/fare, polivinil alkol (PVA), amonyum persülfat (APS), dibutil ftalat (DBF) $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$, kloraurik asit (HAuCl_4), trisodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), amonyak (NH_3), hidroklorik asit (HCl), $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$, 2-2'-bipiridil, kloroform (CHCl_3), aseton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), eter, trietilenamin ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), magnezyum sülfat (MgSO_4), disikloheksilkarbodiimid CH_2C_{12} , α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA), asetonitril ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$), trifloroasetik asit ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$), Aldrich Chemical (USA)'den temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan saf su; Eutech Cybernetics alpha-CON- 1000 marka saf su cihazından sağlanmıştır.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

pH-iyon metre: Metler Toledo Seven Multi

Manyetik karıştırıcı: Variomag Multipoint

Isıtıcı-karıştırıcı: Heidolph MR3001

Hassas terazi: Ohaus Adventurer-Pro

^1H NMR: JEOL GX-400

SEM: FESEM, ZEISS Ultraplus

MALDI-TOF/MS: Voyager Biyospektrometri STR Work Station

3.2. Yöntem

3.2.1. MAT-Ru-MuABt hazırlanışı

Rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerden yola çıkılarak MAT-Ru-MuABt ANADOLUCA (Say R., 2009) yaklaşımı ile sentezlenmiştir. ANADOLUCA [AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpining Conjugation Approach] metodu, enzim, protein ve antibadiler gibi biyomoleküllerin yapısında ve aktivitelerinde bozulma olmaksızın nano ölçekte sentez imkanı sağlar. Bu yöntem, mikroemülsiyon polimerizasyon tekniğine dayanır ve biyomolekülleri rutenyum şelatları ile çapraz bağlar. Hazırlanan nano ölçekli biyomoleküler parçacıkların yapısı, mikroemülsiyon polimerizasyonunun fiziksel ve kimyasal kararlılığı ile güçlendirilmiştir, bu da moleküllerin faaliyetlerinde herhangi bir azalma olmadan tekrar kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır.

3.2.1.1. Diklorobis (2-2'-bipiridil) rutenyum ($\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2$):

$\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ (0,1 g; $2,06 \times 10^{-4}$ mol) ve 2-2'-bipiridil (0,064 g, $1,3 \times 10^{-3}$ mol) kloroform (30 mL) içerisinde 1 saat reflaks edilmiştir. Reaksiyon bitiminde çözücü döner buharlaştırıcı yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Kalıntı aseton içine alınmıştır. Asetondaki çözeltiye dietileter eklenerek turuncu renkli madde çöktürülmüştür. Çöken katı süzülerek ayrılmıştır. Ayrılan katı, eter ile yıkanmış ve vakumda kurutulmuştur (E.N.: 205-210 °C).

3.2.1.2. Klorobis (2-2'-bipiridil) MAT-rutenyum ($\text{RuClMAT}(\text{bipy})_2$):

$\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2$ (0,1 g; $2,064 \times 10^{-4}$ mol) metanolde çözülmüştür. Çözelti 0°C'ye soğutulup, üzerine $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ (triötilenamin) eklenmiştir. Oda sıcaklığına getirilen çözelti üzerine metanolde çözülmüş Ma-T (0,172 g, $4,8 \times 10^{-3}$ mol) damla damla ilave edilmiş ve ardından 55 °C'de 2 gün reflaks edilmiştir. Reaksiyon süresinin bitiminde çözücü uzaklaştırılmıştır. Kalıntı diklorometanda çözülmüş ve 3 kez H_2O ile ekstrakte edilmiştir. Organik fazlar toplanarak MgSO_4 ile kurutulmuştur. Çözücü rotary

evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra sırasıyla eterle yıkama ve vakumda kurutma işlemleri gerçekleştirilmiştir (E.N.:125-128 °C).

3.2.1.3. Bis (2-2'-bipiridil)-MAT-MuABt-rutenyum (RuMAT(MuABt)(bipy)₂):

RuCIMAT(bipy)₂ (0.1 gr; $1,43 \times 10^{-4}$ mol) MetOH içinde çözülmüştür. MuABt (0,046 g, $1,43 \times 10^{-4}$ mol), DMSO içerisinde çözüldürülmüş ve oda sıcaklığında damla damla birinci çözeltiye ilave edilmiştir. Karışım, 110 °C'de 6 saat karıştırılmıştır. Solventler azaltılmış basınç altında çıkarılıp tortu, CH₂C₁₂ içerisine alınmıştır. Organik katman, H₂O (3x10 mL) ile yıkanıp, MgSO₄ üzerinde kurutulmuştur. Daha sonra, eter ile yıkanmış ve vakum altında kurutulmuştur (E.N.:> 220 °C). Şekil 3.3'de Klorobis (2-2'-bipiridil) MAT-rutenyum yapısı görülmektedir.

3.2.2. Karakterizasyon

Rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerin karakterizasyonunda, MALDI-TOF/MS (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) ve ¹H NMR' dan yararlanılmıştır.

3.2.2.1. MALDI-TOF/MS

Tüm MALDI-TOF/MS kütle spektrumları, bir Voyager Biyospektrometri STR Work Station'da alınmıştır ve 337 nm'lik bir pulslu azot lazer kullanmıştır. Hızlanma voltajı 20 kV'a ve gecikme süresi ise 100 ns ayarlanmıştır. Kütle analizi pozitif reflektör modunda gerçekleştirilip, gecikmeli ekstraksiyon modu uygulanmıştır. α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) matris çözeltisi kullanılmıştır. 10 mg CHCA, 1:1 oranında hazırlanmış 1 mL %0,3 TFA solüsyonu ve asetonitril çözeltisinde çözülmüştür. 2 μ L numune çözeltisi, asetonitril/%0,3 TFA içindeki 23 μ L 10 mg/mL'lik CHCA ile karıştırılmıştır. Bu karışım (1 μ L) bir MALDI-TOF/MS numune plakası üzerine yerleştirilip ve kurumaya bırakılmıştır.

3.2.2.2. ¹H NMR

(RuCl₂(bipy)₂, (RuCIMAT(bipy)₂) ve (RuMAT(MuABt)(bipy)₂)'nin ¹H-NMR spektrumu, CDCl₃ içerisinde JEOL GX-400 500 MHz NMR cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Kimyasal kaymalar (δ ppm) cinsinden CDCl₃ referans alınarak rapor edilmiştir.

3.2.3. Altın nanopartikül sentezi

300 mL 0,5 mM HAuCl₄(aq) ısıtılmıştır. Çözelti kaynamaya başladıktan sonra, 30 mL 38,8 mM Na₃C₆H₅O₇ ilave edilip, 5-6 dakika daha kaynatılmıştır.

3.2.4. Nano anti-klenbuterol antibadi hazırlanışı

50 μ L monoklonal anti-klenbuterol antibadi/fare 450 μ L suda çözülmüştür. Çözeltiye, 400 μ L 1000 ppm MAT-Ru-MuABt eklenerek 1 saat karıştırılmıştır. Üzerine, 45 mL suda çözülmüş 0,5 g PVA'dan 18 mL ve 45 mL suda 20 mg çözülmüş APS'den 600 μ L eklenerek polimer hazırlanmıştır.

3.2.5. Nano anti-klenbuterol antibadi-AuNP hazırlanışı

50 μ L monoklonal anti-klenbuterol antibadi/fare 450 μ L suda çözülmüştür. Çözeltiye 400 μ L 1000 ppm MAT-Ru-MuABt eklenerek 1 saat karıştırılmıştır. Üzerine, 45 mL suda çözülmüş 0,5 g PVA'dan 18 mL ve 45 mL suda 20 mg çözülmüş APS'den 600 μ L eklenerek nano anti-klenbuterol hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışımdan 8 mL alınarak üzerine 1 mL altın nanopartikül eklenerek, nano anti-klenbuterol antibadi-AuNP hazırlanmıştır.

3.2.6. İmmunosensörün hazırlanışı

Membran bileşimi; 20 mg aktif kömür (GP), 125 μ L polimer, 15 μ L dibutil fitalat (DBF)'tan oluşmaktadır.

Öncelikle; 20 mg aktif kömür ile 15 μ L dibütil fitalat karıştırılarak bulamaç haline getirilmiştir. Daha sonra üzerine AuNP modifiye edilmemiş immunosensör için, 125 μ L nano anti-klenbuterol antibadi polimeri, AuNP modifiye immunosensör için ise, nano anti-klenbuterol antibadi-AuNP polimeri eklenerek karışmaya bırakılmıştır. 1 saatlik karıştırma işleminden sonra, bakır tel varlığındaki cam borulara doldurulmuştur. Kontrol immunosensörü ise, 20 mg aktif kömür ile 15 μ L dibütil fitalat karıştırılmasıyla elde edilen bulamaç ile hazırlanmış, içine polimer eklenmemiştir. Hazırlanan elektrotlar oda sıcaklığında bir gece beklemeye bırakılmıştır. Şekil 3.1’de tipik bir karbon pasta elektrot görülmektedir.



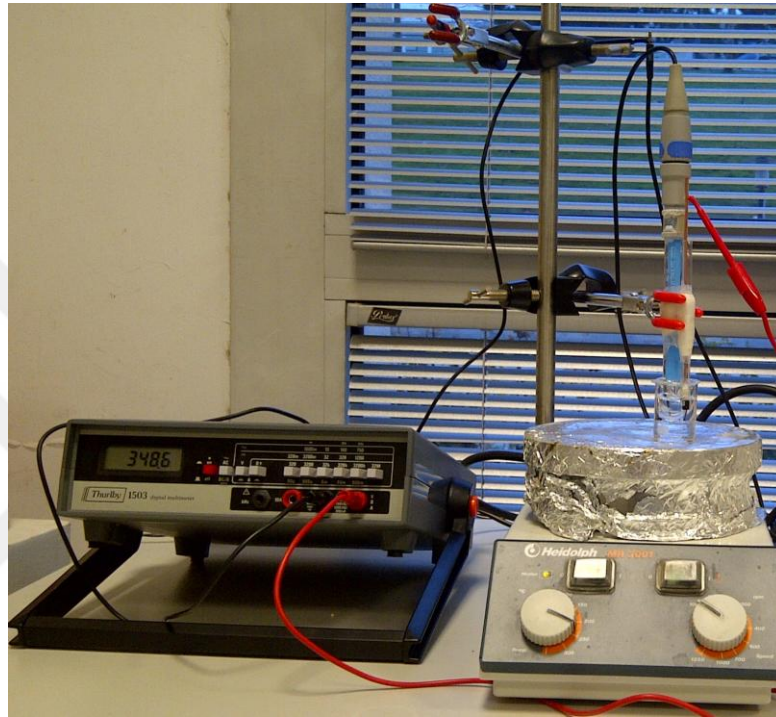
Şekil 3.1. Karbon pasta elektrot

Elektrotlar kuruduktan sonra, membran baget ile iyice sıkıştırılarak ölçüme hazır hale getirilmiştir.

3.2.6.1. Potansiyel ölçüm sistemi

Ölçümlerden önce indikatör elektrot ve referans elektrot saf su ile yıkanmıştır. Potansiyel ölçümleri Ag/AgCl referans elektroduna karşı Multi Meter ile yapılmıştır. Her

ölçümden sonra elektrot yaklaşık 30 dakika 0,25 M metanol/asetik asit (9:1, v/v) ve 3 M KCl ile muamele edilmiştir. Elektrot kullanılmadığı süre içerisinde, saf suda bekletilmiştir. Bir sonraki ölçüme geçerken, karbon pasta elektrodun membran yüzeyi yenilerek işleme başlanmıştır. Şekil 3.2’de potansiyometrik ölçüm sistemi görülmektedir.



Şekil 3.2. Potansiyel ölçüm sistemi

3.2.6.2. İmmunosensörün performansının değerlendirilmesi

a) Derişim etkisi

Modifiye edilmemiş immunosensör, AuNP modifiye immunosensör ve kontrol immunosensör çeşitli derişimlerdeki ($1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-10}$) M 5 mL klenbuterol çözeltileri ile muamele edilmiştir. Oda sıcaklığında, düşük derişimden yüksek derişime olacak şekilde hazırlanan klenbuterol çözeltilerinde 30 dk’lık ölçümler alınmıştır. Her ölçümden sonra elektrot yaklaşık 30 dakika 0,25 M metanol/asetik asit (9:1, v/v) ve 3 M KCl ile muamele edilmiştir. Ölçümler, belirlenen optimum pH değerinde gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler, 3

immunosensör için de aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Potansiyel değişimleri Multi Meter’de belirlenmiştir.

b) pH etkisi

Modifiye edilmemiş immunosensör ve AuNP modifiye immunosensör için, pH yanıt profilini incelemek için 5 mL $1,0 \times 10^{-4}$ M’lık klenbuterol çözeltisinin pH’sı 0,1 M HCl ve 0,1 M NH_3 çözeltileri ile farklı pH’lara (pH:2,0-9,0) ayarlanmıştır. Her pH için 30 dakikalık ölçümler alınmıştır. Her ölçümden sonra elektrot 30 dakika, 0,25 M metanol/asetik asit (9:1, v/v) ve 3 M KCl ile muamele edilmiştir. Ölçümler oda sıcaklığında, Multi Meter’de gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonucunda optimum pH değeri belirlenmiştir.

c) Analitik performansın değerlendirilmesi

Derişimi belli çözeltilere karbon pasta elektrot ve Ag/AgCl referans elektrot daldırılarak elektrokimyasal hücre oluşturulmuştur. Hücrenin potansiyel ölçümleri; oda sıcaklığında ve düşük klenbuterol derişiminden yüksek klenbuterol derişimine doğru gerçekleştirilmiştir. Her bir çözelti için okunan hücre potansiyeli, çözeltilerin derişimine karşı grafiğe geçirilerek, nano anti-klenbuterol antibadi içeren elektrotların kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinden; doğrusal çalışma aralığı ve tayin sınırı tespit edilmiştir. Bu parametreleri belirleyebilmek için standart klenbuterol kullanılarak bir seri ($1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-10}$ M) 50 mL’lik kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin pH’ları 6,0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu işlemler iki immunosensör için de uygulanmıştır.

d) Cevap süresinin belirlenmesi

Cevap zamanının belirlenmesi, immunosensörün algılama yeteneğini ölçen önemli faktörlerden birisidir. İmmunosensörün referans elektroda karşı belli derişimlerdeki klenbuterol çözeltilerinin potansiyelleri farklı zaman dilimlerinde ölçülerek immunosensörün cevap süresi belirlenmiştir. Potansiyelin kararlı hale gelmesi için, gerekli süreler kaydedilmiştir. Potansiyel değerlerinin kararlı hale geldiği süre immunosensörün cevap süresi olarak belirlenmiştir.

e) Tekrar kullanılabilirlik ve ömrünün belirlenmesi

İmmunosensörün tekrar kullanılabilir olması, önemli kriterlerden biridir. Sensörün tekrar kullanılabilirliğini belirleyebilmek için, aynı derişim ve pH'daki klenbuterol çözeltilerinin potansiyeli ölçülmüştür. Her bir ölçümden sonra referans ve indikatör elektrot saf su ile yıkanmış, daha sonra diğer ölçüm alınmıştır. Bu işlemler her iki immunosensör için de uygulanmıştır.

Sensörlerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla potansiyometrik ölçüm işlemi 10 kez tekrarlanmıştır. Bu işlem pH=6,0'da $1,0 \times 10^{-4}$ M'lık klenbuterol çözeltilisi ile yapılmıştır. Her ölçümden sonra elektrot yaklaşık 30 dakika 0,25 M metanol/asetik asit (9:1, v/v) ve 3 M KCl ile muamele edilmiştir.

f) Seçiciliğin belirlenmesi

İmmunosensörün, çeşitli moleküller ile etkileşebileceği ve moleküllerin sensörün performansını etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, sensörün moleküler olarak benzerlik gösteren terbütalin hemisülfat ($C_{12}H_{19}NO_3 \cdot \frac{1}{2} H_2SO_4$) molekülüne karşı seçiciliği belirlenmiştir. Terbütalin hemisülfatın potansiyometrik sensörün cevabına etkilerini belirlemek ve seçicilik katsayılarını tayin etmek için, Fixed metodu ve Matched metodu kullanılmıştır.

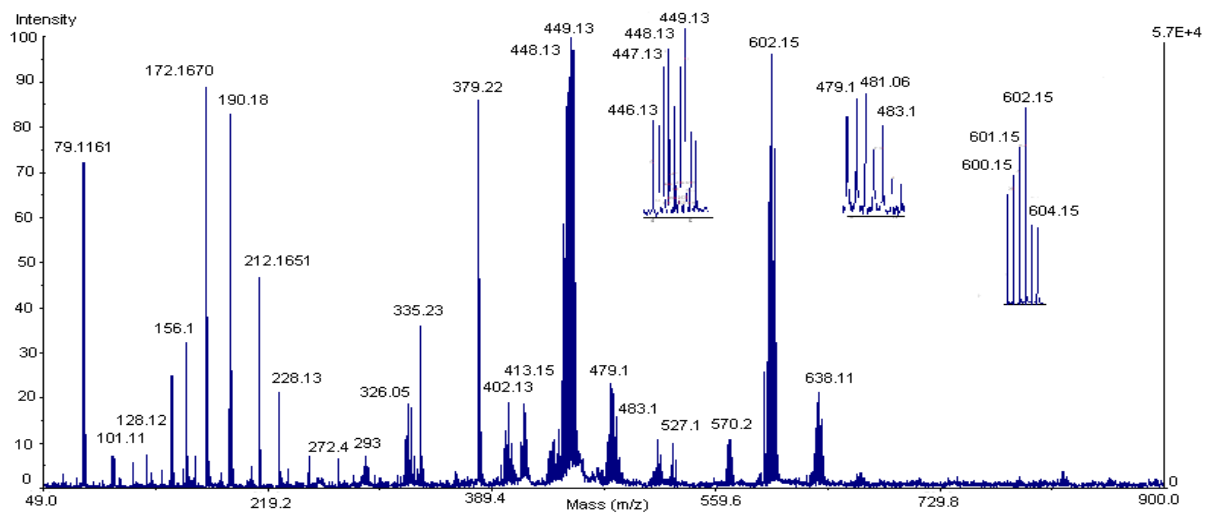
3.2.7. Gerçek örnek hazırlanması

Süpermarketten satın alınmış süt örnekleri, 10 mL'lik bir volumetrik şişeye aktarılmıştır. Ardından, klenbuterol solüsyonu ilave edilmiş ve damıtılmış su ile seyreltilmiştir. Sütteki klenbüterol, potansiyometrik immunosensör kullanılarak standart ilave yöntemi ile tespit edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Karakterizasyon

Rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerden yola çıkılarak MAT-Ru-MuABt ANADOLUCA (Say R., 2009) yaklaşımı ile sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir.

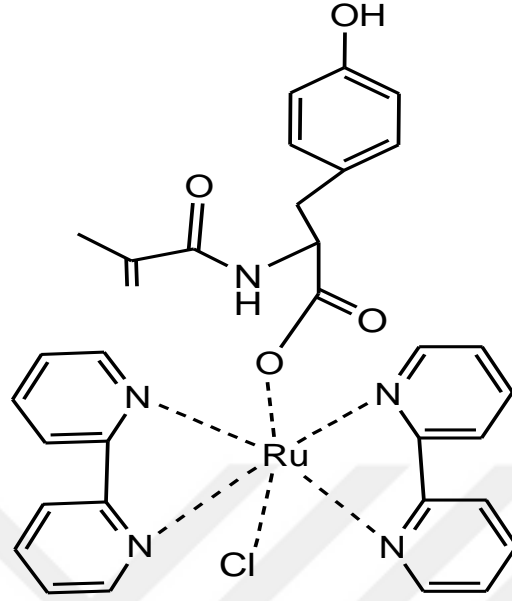


Şekil 4.1. MALDI-TOF/MS $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ spektrumu

2 μL $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ çözeltisi, 23 μL 10 mg/mL asetonitril / % 0.3 TFA içindeki CHCA çözeltisi ile karıştırıldı. Hızlanma voltajı 20 kV, gecikme süresi 100 ns, ızgara voltajı % 65, lazer yoğunluğu 2200 ve yansıtıcı moda ayarlanmıştır.

Şekil 4.1'de MALDI-TOF/MS $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ spektrumu görülmektedir. İyon, bipyridil ile ilgili olarak 79, 128 ve 157 m/e'de tepe noktalarıdır. m/e 101, 413 sırasıyla Ru ve Ru (bpy)₂'yi gösterir. m/e 293, 327, 448 ve 484 sırasıyla RubpyCl, RubpyCl₂, Ru(bpy)₂Cl ve Ru(bpy)₂Cl₂. Bu spektrumda Ru(bpy)₂Cl₂ yapısının tam olarak üretildiği teyit edilmiştir. m/e 172, 190, 212 ve 379 ise CHCA matriksi ile ilgilidir.

4.1.2. Klorobis(2-2'-bipiridil)MAT-rutenyum ($\text{RuClMAT}(\text{bipy})_2$):



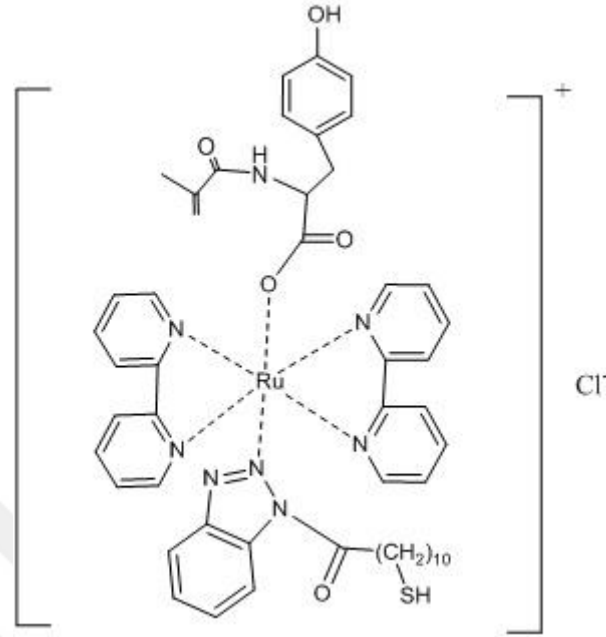
Şekil 4.2. Klorobis (2-2'-bipiridil) MAT-Rutenyum

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

Elementel analiz: $\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{ClN}_5\text{O}_4\text{Ru}$: Deneysel: C 56.75%, H 5.01%, N 10.23%, Teorik: C 56.85%, H 4.34%, N 10,05%.

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

4.1.3. Bis(2-2'-bipiridil)-MAT-MuABt-rutenyum(II) (RuMAT(MuABt)(bipy)₂):



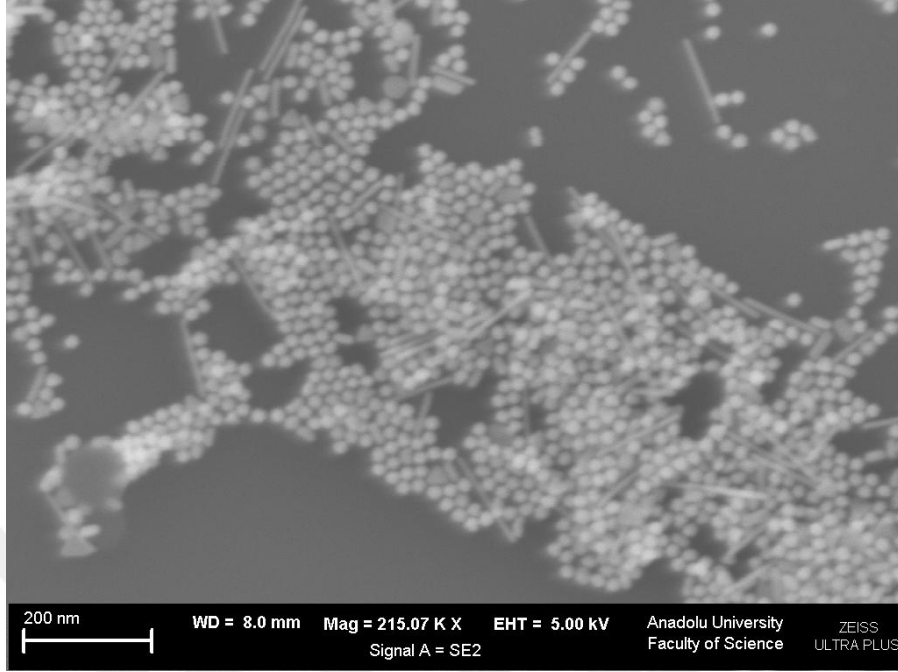
Şekil 4.3. Bis(2-2'-bipiridil)-MAT-MuABt-Rutenyum(II)

Şekil 4.3'de moleküler yapısı görülen Bis(2-2'-bipiridil)-MAT-MuABt-Rutenyum(II) bileşiği için;

Elementel analiz: C₅₀H₅₅N₈O₅RuS: Deneysel: C 61.53%, H 4.92%, N 12.99%, Teorik.: C 59.07%, H 5.45%, N 11.02%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), ppm: 8.32 (d, 1H, J= 9.72 Hz), 8.14 (d, 1H, J= 8.26 Hz), 7.89 (s, 2H), 7.67 (t, 1H, J=7.66 Hz), 7.52 (t, 1H, J= 7.65 Hz), 7.41 (d, 2H, J=5.86 Hz), 3.68 (s, 10H), 3.44 (t, 2H, J= 7.48 Hz), 2.88 (t, 6H, J= 7.33 Hz), 2.33 (m, 16H), 1.92 (p, 3H), 1.74 (t, 8H, J= 7.35 Hz).

4.1.4. Nano anti-klenbuterol antibadi-AuNP



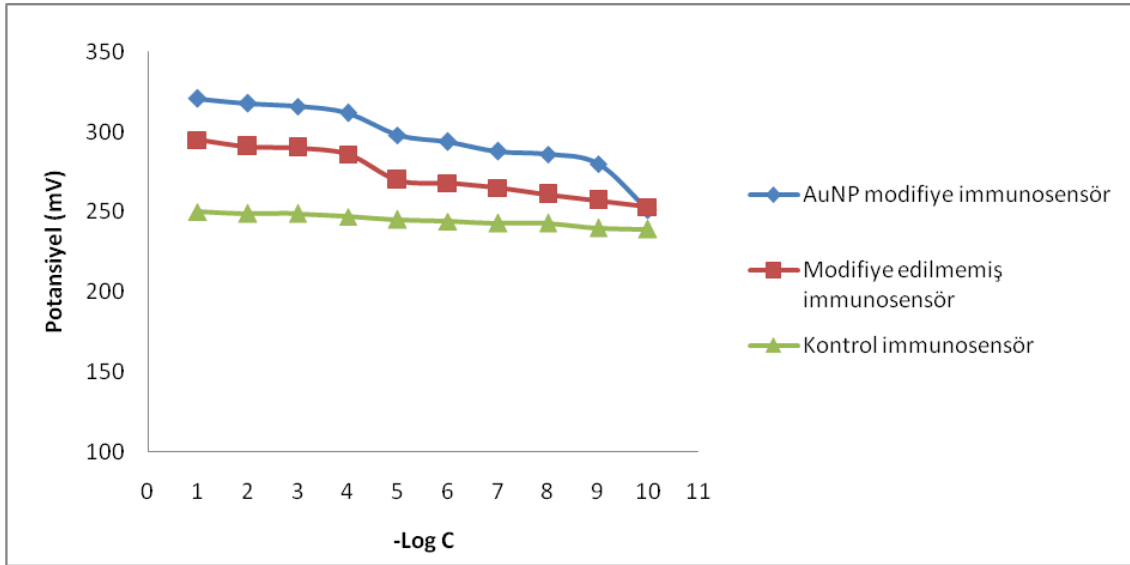
Şekil 4.4. Nano anti-klenbuterol antibadi-AuNP SEM görüntüsü

Nano anti-klenbuterol antibadi-AuNP, taramalı elektron mikroskobu ile karakterize edilmiştir (FESEM, ZEISS Ultraplus). Şekil 4.4 SEM fotoğrafında görüldüğü gibi, nano anti-klenbuterol antibadi-AuNP' nin her biri küresel şekle sahiptir ve boyut dağılımı 200 nm civarındadır.

4.2. İmmunosensör ile Yapılan Ölçümler

4.2.1. Derişim etkisi

Modifiye edilmemiş immunosensör, AuNP modifiye immunosensör ve kontrol immunosensör çeşitli derişimlerdeki ($1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-10}$ M) klenbuterol çözeltileri ile muamele edilmiştir. Bu sistemin bağlı olduğu potansiyometrede klenbuterol derişimine bağlı olarak potansiyel değerleri mV cinsinden okunmuştur. Cihazda okunan değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.5).

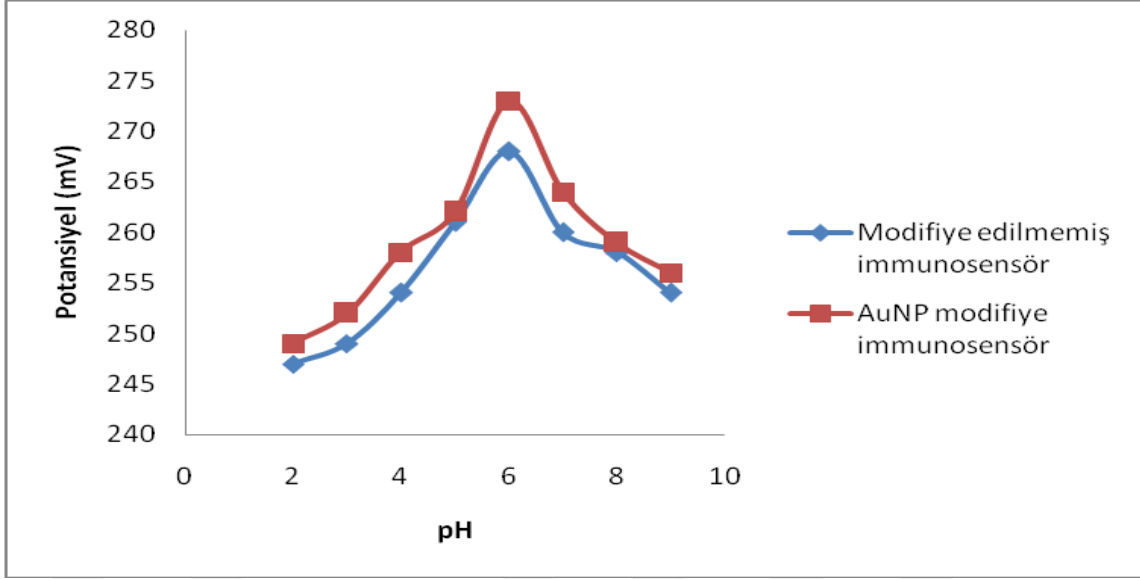


Şekil 4.5. İmmunosensöre klenbuterol derişiminin etkisi (pH:6, C: $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-10}$ mM, T: 25 °C)

Şekil 4.5’ de görüldüğü gibi altın nanopartikül (AuNP) modifiye immunosensör, modifiye edilmemiş immunosensöre göre daha yüksek potansiyelde tepki verdiği gözlenmiştir. Sensörler nanopartiküllerle modifiye edildiklerinde hem sensörün yüzey alanını arttırarak immobilizasyon verimini arttırmakta hem de elektron aktarım hızını arttırarak daha düşük tayin limitlerine inilebilmesine olanak sağlamaktadır. (Luo, vd., 2006). Bu sebeple, AuNP modifiye immunosensörde daha yüksek potansiyel elde edilmiştir. En düşük potansiyel değeri ise kontrol immunosensöründe gözlenirken, artan derişimin kontrol immunosensörünün potansiyeli üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

4.2.2. pH’nın etkisi

İmmunosensörlerin, optimum pH’sının belirlenmesi için, $1,0 \times 10^{-4}$ M klenbuterol çözeltisinin pH’sı 2,0-9,0 aralığında değiştirilerek potansiyeli ölçülmüştür. İmmunosensöre, pH etkisi Şekil 4.6’da verilmiştir.

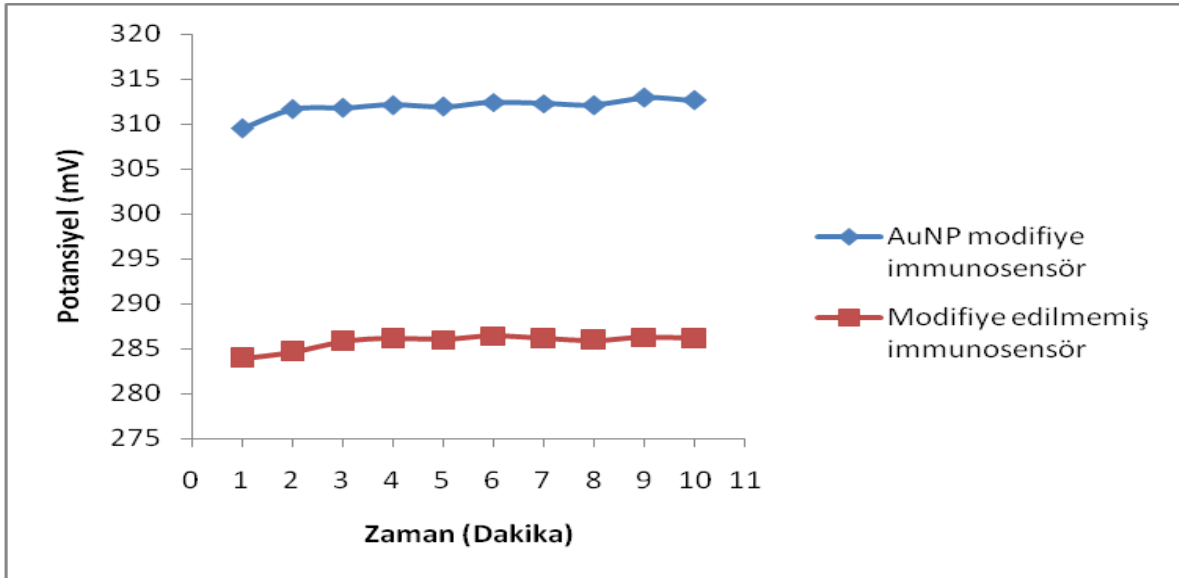


Şekil 4.6. İmmunosensöre pH etkisi (C: $1,0 \times 10^{-4}$ mM, T: 25°C)

Şekil 4.6'dan da görüldüğü gibi her iki immunosensörde de, pH 6,0'ya kadar potansiyel önemli ölçüde artış göstermiş, pH 6,0'da maksimum değere ulaşmıştır. pH arttıkça ise, potansiyelde düşüş gözlenmiştir. AuNP modifiye immunosensörün iletkenliği daha yüksek olduğu için AuNP modifiye edilmemiş immunosensöre göre daha yüksek potansiyel gözlenmiştir.

4.2.3. Cevap süresi

Cevap zamanının belirlenmesi, immunosensörün algılama yeteneğini ölçen bir diğer önemli faktördür. Bir sensörün analitik çalışmalarda etkin şekilde kullanılabilmesi için cevap süresinin kısa olması tercih edilir. Hem AuNP modifiye edilen hem de edilmeyen immunosensörde, $1,0 \times 10^{-4}$ mM klenbuterol çözeltileri ile immunosensörün zamana karşı potansiyometrik davranışı incelenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. İmmunosensörün cevap zamanı (pH:6.0, C: $1,0 \times 10^{-4}$ mM, T:25⁰C)

Şekil 4.7' de görüldüğü gibi, $1,0 \times 10^{-4}$ mM AuNP modifiye immunosensör yaklaşık 2 dakikada, modifiye edilmemiş sensörün ise, yaklaşık 3 dakikada karara geldiği tespit edilmiştir.

4.2.4. Seçicilik çalışmaları

Terbütalin hemisülfatın, potansiyometrik sensörün cevabına etkilerini belirlemek ve seçicilik katsayılarını tayin etmek için, Fixed metodu ve Matched metodu kullanılmıştır. Fixed metodunda, seçiciliği incelenecek olan terbütalin hemisülfata, farklı derişimlerde klenbuterol çözeltileri eklenerek bir grafik oluşturulmuş ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen değerler doğrultusunda seçicilik katsayıları hesaplanmıştır. Matched metodunda ise, klenbuterol çözeltilisine seçiciliği incelenecek olan terbütalin hemisülfat farklı derişimlerde eklenerek elde edilen potansiyel ölçümleri yardımıyla seçicilik katsayıları hesaplanmıştır. AuNP modifiye immunosensör ve AuNP modifiye edilmemiş immunosensör için farklı metodlarla yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen seçicilik katsayıları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

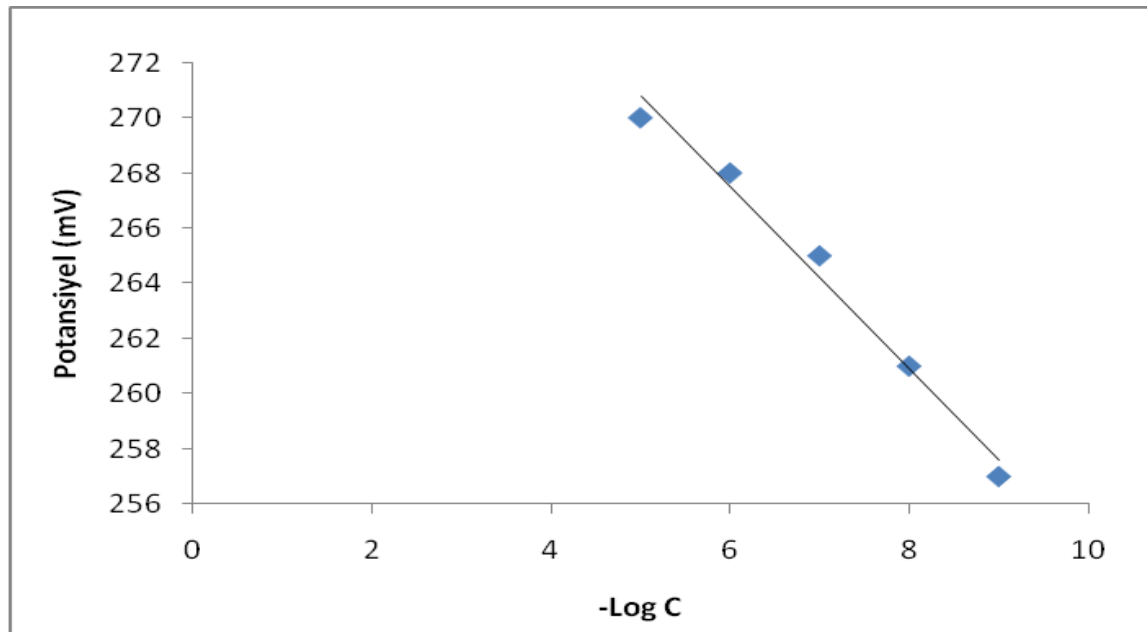
Çizelge 4.1. AuNP modifiye immunosensörün ve AuNP modifiye edilmemiş immunosensörün farklı metodlarda hesaplanmış seçicilik katsayıları

Metod	AuNP modifiye immunosensör	Modifiye edilmemiş immunosensör
Fixed Metodu	0,3	2,6
Matched Metodu	0,02	1,8

IUPAC' a göre eğer seçicilik katsayısı 1'den büyükse, iyon seçici elektrot diğer iyonlara hedef iyondan daha çok seçicilik gösterir. Çoğu durumda seçicilik katsayısı 1'den küçüktür, bu da iyon seçici elektrodun hedef iyonla daha seçici davrandığını göstermektedir. Çizelge 4.1' e göre AuNP modifiye immunosensörün seçicilik katsayıları 1'den küçük, AuNP modifiye edilmemiş immunosensörün seçicilik katsayıları ise 1'den büyüktür, bu da modifiye elektrodun hedef moleküle karşı daha seçici olduğunu göstermiştir.

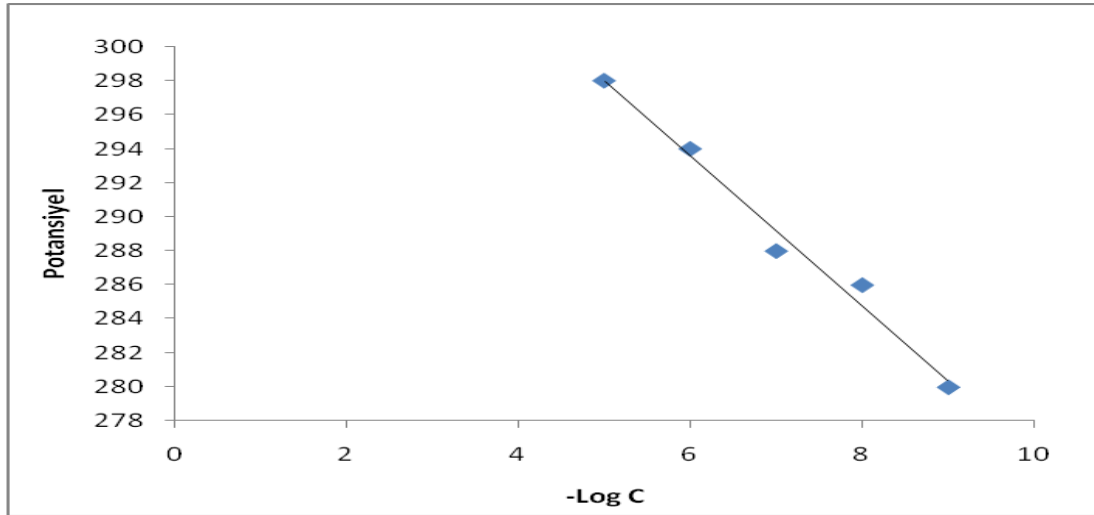
4.2.5. Analitik performans

Modifiye edilmemiş immunosensörün tayin limiti $0,5 \times 10^{-9}$ mmol/L olarak bulunmuştur. Ayrıca sensörün, $1,0 \times 10^{-9}$ ile $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L derişim aralığında algılama sınırının olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Modifiye edilmemiş immunosensörün doğrusal çalışma aralığı (pH:6,0, T:25°C)

AuNP modifiye immunosensörün tayin limiti $0,2 \times 10^{-9}$ mmol/L olarak bulunmuştur. Sensörün, $1,0 \times 10^{-9}$ ile $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L derişim aralığında lineerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. AuNP modifiye immunosensörün doğrusal çalışma aralığı (pH:6,0, T:25⁰C)

Çizelge 4.2. İmmunosensörün tayin limitinin literatür ile karşılaştırılması

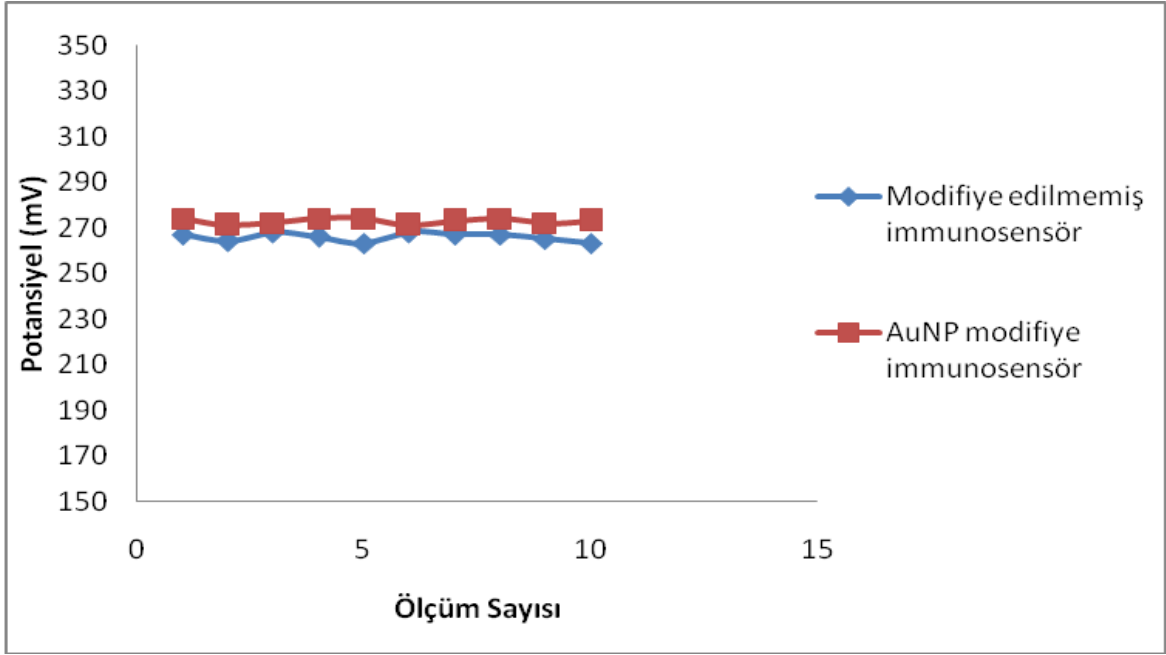
Çalışma	Tayin Limiti
Bu çalışma, modifiye edilmemiş immunosensör	$0,5 \times 10^{-9}$ mM
Bu çalışma, AuNP modifiye immunosensör	$0,2 \times 10^{-9}$ mM
Liang vd., 2012, İyon seçici elektrot	$7,0 \times 10^{-5}$ mM
Dou vd., 2015, İmmunosensör	$2,7 \times 10^{-7}$ mM
Wang vd., 2014, Elektrokimyasal sensör	$2,2 \times 10^{-5}$ mM

Yao vd., 2013, Elektrokemilüminesans immunosensör	$7,2 \times 10^{-8}$ mM
Zhan vd., 2013, Amperometrik immunosensör	$3,6 \times 10^{-9}$ mM

Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi hem AuNP modifiye edilmiş immunosensör hem de AuNP modifiye edilmemiş immunosensör literatüre üstünlük sağlamıştır. AuNP modifiye edilmiş immunosensör ile AuNP modifiye edilmemiş immunosensör kıyaslandığında ise, AuNP modifiye edilen immunosensörün daha düşük tayin limitine sahip olduğu görülmüştür. Nanopartiküller, elektrotlara modifiye edildiklerinde elektron aktarım hızını artırarak daha düşük tayin limitlerine inilebilmesine imkan sağlamaktadır. AuNP modifiye edilen immunosensörde bu etki görülmüş ve AuNP modifiye edilmeyen immunosensöre üstünlük sağlamıştır.

4.2.6. İmmunosensörün tekrar kullanılabilirliği ve ömrünün belirlenmesi

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi, belirlenen optimum derişim ve pH değerlerinde ard arda yapılan 10 ölçüm sonucunda, modifiye edilmemiş immunosensörün ve AuNP modifiye edilmiş immunosensörün potansiyelinde kayda değer bir azalma olmamıştır. Hazırlanan immunosensörler, kararlı bir yapıya sahip olup 5-6 ay süreyle kullanılmıştır. Kayıp olmadan 10'a kadar tekrar edilebilir çalışmalar ortaya koyulmuş ve yeteneklerinde herhangi bir kayba rastlanmamıştır.



Şekil 4.10. İmmunosensörün tekrar kullanılabilirliği (pH:6,0, C: $1,0 \times 10^{-4}$ mM klenbuterol, T:25⁰C)

İmmunosensörlerin ömrünün belirlenmesi için ise, her gün kalibrasyon çözeltilerinde ölçüm alınarak potansiyel değişimi gözlenmiştir. AuNP modifiye edilmiş immunosensörün ve modifiye edilmemiş immunosensörün 5-6 ay süresince kararlı bir şekilde kullanılabildikleri görülmüştür.

4.3. Gerçek örnek analizi

Sütteki klenbuterol miktarını belirlemek için potansiyometrik immunosensör kullanılmış ve numunelerde klenbuterol tespit edilmemiştir. Aynı koşullar altında farklı konsantrasyonlardaki klenbuterol standartları numuneye eklenerek analiz edilmiştir. RSD % 8,2 olarak elde edilmiştir, bu da potansiyometrik immunosensörden elde edilen sonuçların kabul edilebilir olduğunu göstermiştir. Klenbuterol içeriği standart ekleme yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir. Geri kazanım değeri % 87 ile % 95 aralığında elde edilmiştir ve bu da yöntemin doğru ve uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.3. Standart ilave yöntemi ile sütteki klenbuterol tayini

Eklenen (μgL^{-1})	Modifiye edilmemiş immunosensör (μgL^{-1})		AuNP modifiye immunosensör (μgL^{-1})	
	Bulunan	Gerikazanım (%)	Bulunan	Gerikazanım (%)
-	-	-	0,01	-
6	4,9	81	5,25	87
18	15,75	85	17,1	95

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Klenbuterolün hayvan dokularında birikmesi, hayvansal gıdaları tüketen insanlar için ciddi önem taşımaktadır. Bu nedenle klenbuterol tayini oldukça önemlidir. Klenbuterolün tayini için farklı yöntemlerle yapılan birçok çalışma mevcuttur. Fakat bu yöntemlerde kullanılan ekipmanların pahalı olması, uzun işlem gerektirmesi, zaman alıcı olması ve pratik olmaması gibi olumsuzluklar yeni yöntemlerin geliştirilmesine sebep olmuştur. Bu yöntemlerden biri de, potansiyometrik immunosensördür. İmmunosensörler, uygun antijen ile antikorun kompleks oluşumu esasına dayanan biyosensörlerdir. Çalışmamızda, klenbuterole karşı oldukça yüksek spesifikliğe sahip olan nano anti-klenbuterol antibadi kullanılmıştır. Altın nanopartikül modifiye edilmesi iletkenliğin artırılmasını sağlamış ve daha hızlı, seçici, hassas bir tayin gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak MAT-Ru-MuABt sentezlenmiş, monoklonal anti-klenbuterol antibadının sulu çözeltisine eklenerek 1 saat karıştırılmıştır. Üzerine suda çözülmüş PVA ve APS eklenip nano anti-klenbuterol antibadi hazırlanmıştır. İkinci aşamada, altın nanopartikül sentezlenmiş ve hazırlanan karışıma eklenerek, nano anti-klenbuterol antibadi, altın nanopartikül ile modifiye edilmiştir. Elde edilen bu polimerler, karbon pasta elektrot yapımında kullanılmıştır.

AuNP modifiye edilmemiş immunosensör, AuNP modifiye immunosensör ve kontrol immunosensör olmak üzere üç çeşit karbon pasta elektrot hazırlanmış ve elektrotların potansiyometrik davranışları incelenmiştir. Karbon pasta elektrotlar kolayca yenilenebilen ve modifiye edilen bir yüzeye sahip olup, düşük maliyet ve çok düşük zemin akımı göstermektedir. Yapım ve yenilenmeleri kısa süreli ve kolaydır. Karbon pasta elektrotlar yapısında bulunan elektrolitik madde olan grafit tozundan dolayı hiçbir ön işleme gerek duyulmadan kolaylıkla hazırlanıp işlemler için kullanıma uygun hale getirilebilir. Karbon pasta elektrotların laboratuvar ortamında karıştırılarak hazırlanması avantajdır çünkü bileşikleri ve oranlarını araştırmacı kendi seçebilir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, AuNP modifiye immunosensörün, modifiye edilmemiş immunosensöre göre yüksek potansiyelde tepki verdiği gözlenmiştir.

İki immunosensörün de pH yanıt profili incelenmiş ve her iki immunosensörün pH 6,0'da maksimum potansiyel gösterdiği belirlenmiştir.

AuNP modifiye immunosensörün ve AuNP modifiye edilmemiş immunosensörün seçiciliği Fixed, Matched metodu kullanılarak incelenmiş, Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında AuNP modifiye immunosensörün, AuNP modifiye edilmemiş immunosensöre üstünlük sağladığı görülmüştür.

Modifiye edilmemiş immunosensörün, $1,0 \times 10^{-4}$ mM derişimde yaklaşık 3 dakika gibi kısa bir sürede karara geldiği, AuNP modifiye immunosensörün ise, $1,0 \times 10^{-4}$ mM derişim içinde yaklaşık 2 dakika gibi kısa bir sürede karara geldiği tespit edilmiştir.

Her iki immunosensörün de tayin limiti literatürle kıyaslandığında daha düşük değerler elde edilmiştir ve sensörlerin $1,0 \times 10^{-9}$ ile $1,0 \times 10^{-5}$ mM derişim aralığında algılama sınırının olduğu tespit edilmiştir. AuNP modifiye immunosensörün tayin limiti $0,2 \times 10^{-9}$ mmol/L olarak bulunurken, modifiye edilmemiş immunosensörün tayin limiti $0,5 \times 10^{-9}$ mmol/L olarak bulunmuştur. Hazırlanan immunosensörlerin tayin limitleri kıyaslandığında; AuNP modifiye edilen sensörün daha düşük tayin limiti değerine sahip olduğu ve dolayısıyla daha avantajlı olduğu görülmüştür.

Her iki immunosensörle de potansiyometrik ölçümler alınmıştır. Ölçümler ardı ardına yapılarak sensörlerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. 10 kez tekrardan sonra bile sensörlerin potansiyometrik davranışında herhangi bir değişime rastlanmamıştır. Kullanım ömürleri incelendiğinde ise, 5-6 ay kararlı bir yapıya sahip şekilde kullanılabilir oldukları görülmüştür.

Son olarak, sütteki klenbuterol, potansiyometrik immunosensör kullanılarak standart ilave yöntemi ile tespit edilmiş, elde edilen sonuçlar doğrultusunda RSD 8,2 ve geri kazanım değerleri %87 ile %95 aralığında elde edilmiştir ve bu da yöntemin doğru ve uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Hazırlanan immunosensörler, klenbuterol tayininde daha basit, pratik ve ucuz tayin imkânı sağlamıştır. Potansiyometrik sensörlerin genelde düşük tayin sınırlarına

ulaşamaması dezavantajlarıdır. Hazırlanan sensörlerde ise, literatürle kıyaslandığında gerek seçicilik, gerekse tayin sınırı açısından literatüre üstünlük sağlanmıştır. AuNP modifiye immunosensörün, modifiye edilmemiş immunosensöre göre daha kısa sürede dengeye geldiği, daha düşük tayin limitine sahip olduğu, kullanım ömrünün daha uzun ve kullanımının daha pratik olduğu görölmüştür. Hazırlanmış olan potansiyometrik immunosensörlerin, ekonomik ve etkin analizinden dolayı veterinerlikte, gıda teknolojisi, polimer ve sensör teknolojisinde kullanım imkanı bulacağı düşünölmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbas, A.K., Lichtman, A., Pober, J., 1994, Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company 2. baskı, Philadelphia, p.539.
- Amemiya, S., Bühlmann, P., Umezawa, Y. 1998. A phase boundary potential model for apparently "Twice-Nernstian" responses of liquid membrane ion-selective electrodes. *Anal. Chem.*, 70(3), 445-454.
- Amendola, L., Colamonici, C., Rossi F., Botrè F., 2002, Determination of clenbuterol in human urine by GC-MS-MS-MS: confirmation analysis in antidoping control, *Journal of Chromatography B*, 773, 7-16.
- Anonim, 1991, A.Ü., Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalındaki veteriner ilaç müstahzarları kayıtları.
- Asefa, T., Duncan, C.T., Krishna, K.S., 2009, Recent advances in nanostructured chemosensors and biosensors, *Analyst*, 134, 1980-1990.
- Aydın, M., 2000, Endodontik İmmünoloji, Endodonti, (Editör: Alacam T.), Barış Yayınları, s.385.
- Bilgehan, H., 1993, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, 6. Baskı, Barış Fakülteler Kitabevi, İzmir, s.622.
- Blanca, J., Muñoz, P., Morgado, M., Méndez, N., Aranda, A., Reuvers, T., 2005, Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 529, 199-205.
- Botsoglou N.A., 2000, Drug residues in foods: Pharmacology, food safety, and analysis. New York, NY, USA, Marcel Dekker Incorporated, 203-206.
- Botterblom, M.H.A., Feenstra, M.G.P., Erdtsieck-Ernste, E.B.H.W., 1993, Determination of propranolol, labetalol and clenbuterol in rat brain by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 613, 121-126.
- Bühlmann, P., Pretsch, E., Bakker, E., 1998, Carrier-based ion-selective electrodes and bulkoptodes. 2. ionophores for potentiometric and optical sensors. *Chemical Reviews*, 98(4), 1593-1688.
- Chambers, J.P., Arulanandam, B.P., Matta, L.L., Weis, A., Valdes, J.J., 2008, Biosensor recognition elements. *Curr Issues Mol. Biol.*, 10(1-2), 1-12.
- Chang, L., Chou, S., Hwang D., 2005, High performance liquid chromatography to determine animal drug clenbuterol in pork, beef and hog liver, *Journal of Food and Drug Analysis*, 13, 163.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Coffman, R.J., Beran, G.W., 1999, Use of drugs in food animals, Benefits and Risks. Committee on drug use in food animal, Panel on animal health, Food Safety and Public Health, National academic press, Washington D.C, p.87.
- Cormack, P. A. G., Elorza A. Z., 2004, Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation, *Journal chromatography B*, 804, 173-182.
- Courant, F., Pinel, G., Bichon, E., Monteau, F., Antignac, J.P., Bizec, B.L., 2009, Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves, *Analyst*, 134, 1637–1646.
- Covington A.K., 1974, Ion-selective elektrodeler, *Anal. Chem.*, CRC Critical Reviews in Cremlyn, R. J., 1991, Agrochemicals, Preparation and Mode of Action, John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester West Sussex PO 19 1 UD, England. *Anal. Chem.*, 396, 355-406.
- D’Orazio, P., 2003, Biosensors in Clinical Chemistry, *Clin. Chim. Acta*, 334, 41-69.
- Dominguez-Romero, J.C., Garcia-Reyes, J.F., Martinez-Romero, R., Martinez-Lara, E., Del Moral-Leal, M.L., Molina-Diaz, A., 2013, Detection of main urinary metabolites of beta2-agonists clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high resolution mass spectrometry, *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 923–924, 128–135.
- Edder P., Cominoli A., Corvi C., 1999, Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection, *J. Chromat. A.*, 830, 345-351.
- Eren, H., 2006, Bütünüyle katı-hal PVC-membran ve kompozit nitrat-seçici potansiyometrik sensörler ve uygulamaları, Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 142.
- Ergün, H., 1988, Hormon ve hormon benzeri anabolik ajanlar", *A.O. Vet.Fak.Derg.*, 35 (2-3), 353-363.
- Geng, Y., Zhang, M., Yuan, W., Xiang, B., 2011, Modified dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of clenbuterol in swine urine, *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 28, 1006–1012.
- Goldman E., 2004, Microbial Risk Assessment. Antibiotic abuse in animal agriculture: Exacerbating drug resistance in human pathogens. *Hem. Ecol. Risk Assess.*, 10, 121-134.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Güre, R., 2005, Düşük sıcaklık amonyak gaz sensörlerin geliştirilmesi ve uygulamaları, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 72.
- Gürmen, S., Ebin, B., 2008, Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1, TMMOB Metalurji Dergisi, 150, 31-38.
- Harvey, D., 2000, Modern Analytical Chemistry, Quebecor Printing Book Group, Kingsport, p.797.
- Hou, M. Y., 2005, Eleboration Et Caracterisation de Biofilms Pour Micro et Nanobiocapteurs Olfactifs, cegely.eclyon.fr/IMG/pdf/These_Yanxia_Hou_2005.pdf
- Kamber, U., 1990, Hayvaansal besinlerde antibiyotik kalıntılarının önemi, E.B.K.Dergisi, 61, 18-23.
- Kaplan, Ö., 2007, Pb(II)-Seçici PVC elektrot hazırlanması ve analitik uygulamaları, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi, s.128.
- Kaya S., 1991, Gelişmeyi hızlandırıcı maddeler. Veteriner farmakoloji ve ilaçla sağıtım seçenekleri (Şanlı Y, Kaya S.), Medisan Yayınevi No 4, Ankara, 544-550.
- Kaya S., Ünsal A., 2002, Besinlerde İlaç Kalıntıları ve Denetimi. Editörleri Kaya S., Pirinççi İ., Bilgili A., Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji kitabı içinde 16. Bölüm., 2. Cilt, 3. Baskı, Ankara, Medisan Yayın Evi, 737-768.
- Kaya S., Yavuz H., Akar F., Liman B.C., Filazi A., 1992, Mezbahadan sağlanan sığır et, karaciğer ve böbrek örneklerinde antibiyotik kalıntıları. A.Ü. Vet. Fak. Derg.,390(1-2), 13-29.
- Kaya, S., 1984, Hayvansal üretimde gelişmeyi hızlandırıcı maddeler ve sakıncaları. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 31(3), 410-423.
- Kaya, S., 1994, Gelişmeyi hızlandırıcı maddeler, Veteriner Farmakoloji ve ilaçla Sağaltım Seçenekleri (Şanlı, Y., Kaya, S.). 2. Baskı. Medisan yayınevi, Ankara, 556-567.
- Kaya, S., Pirinççi, İ., 2007, Gelişmeyi hızlandırıcı maddeler. Alınmıştır: Veteriner Farmakoloji Cilt 2, Baskı 4. (Editör: S.Kaya). Medisan Yayın Serisi: 65, Ankara.
- Kaya, S., Pirinççi, İ., Traş, B., Ünsal, A., Bilgili, A., Akar, F., Doğan, A., Yarsan, E., 2002a, Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, 2.Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Kayaalp, S.O., 1989, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 5. Baskı, Cilt 1, Feryak Matbaacılık, Ankara, 511-874.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kayaalp, S.O., 1990, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 4.Baskı, Cilt 3, Ankara, 2626-2647.
- Kohler, G., Milstein, C., 1975, Nature, 256, 495-497.
- Libby, J.A., 1975, Toxic residues, Meat Hygiene, fourth ed., Lea Febiger, Philadelphia, 474-476.
- Liman B.L., 1994, Anabolik ilaçlar, Türk Vet. Hek.Dern. Derg., 65(4), 53-61.
- Liu, B., Yan, H., Qiao, F., Geng, Y., 2011, Determination of clenbuterol in porcine tissues using solid-phase extraction combined with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC-UV detection, Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 879, 90-94.
- Lone K.P., 1997, Natural sex steroids and their xenobiotic analogs in animal production: Growth, carcass quality, pharmacokinetics, metabolism, mode of action, residues, methods and epidemiology. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 37(2), 93-209.
- Luo, X., Morrin, A., Killard, A.J., Smyth, M.R., 2006, Electroanalysis, Vol., 18(4), 319-326.
- Luppa, P.B., Sokoll, L. J. And Chan, D. W., 2001, Immunosensors-Principles and Applications to Clinical Chemistry”, Clin. Chim. Acta, 314, 1-26.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2010, Su Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar, Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, (Çeviri Editörü: Çökmüş, C.), Palme Yayıncılık, 11. Baskıdan çeviri, Ankara, s.992.
- Martin, E.J., 2001, Composite Films for Modifying Evanescent Wave Characteristics in Long-Period Grating, Master's Thesis, http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-02172001_014116/unrestricted/JEMartinETD.pdf (13.04.2011).
- Morales-Trejo, F., León, S.V., Escobar-Medina A., Gutiérrez-Tolentino R., 2013, Application of high-performance liquid chromatography-UV detection to quantification of clenbuterol in bovine liver samples, Journal of Food and Drug Analysis, 21, 414-420.
- Morf, W.E., 1981, The principles of ion-selective electrodes and of membrane transport. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.
- Nan, Liua N., Sua, P., Gaoa, Z., Zhub, M., Yangb, Z., Panb, X., vd., 2009, Simultaneous detection for three kinds of veterinary drugs: Chloramphenicol, clenbuterol and 17-beta-estradiol by high-throughput suspension array technology, Analytica Chimica Acta., 632, 128-134.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nouws, J.F.M., 1981, Tolerantes and detection of antimicrobiol residues in slaughtered animals. *Archiv' für Lebensmittelhygiene*, 32, 97-140.
- Öztürk, A.İ., 2002, 2002 Yılı Hayvancılık Grubu Bilgi Alışveriş Toplantısı Bildirileri, 167-173.
- Paulson, G.D., Fiel, V.J., Giddings, J.M., 1992, Lamoreux CH, Lactose conjugation of sulphonamide drugs in the lactating dairy cow, *Xenobiotica*, 22, 925-939.
- Pfaffl M.W., Reck B., Dreher R., Meyer H.H.D., 2003, Production of clenbuterol, diethylstilbestrol and trenbolone mass standards in lyophilised bovine urine. *Anal. Chim. Acta.*, 483, 401- 412.
- Poelmans, S., De Wasch K., Noppe, H., Van Hoof N., Van Cruchten, S., v.d., 2005, Endogenous occurrence of some anabolic steroids in swine matrices. *Food Add. Contam.*, 22(9), 808-815.
- Polettini A., 1996, Bioanalysis of 2-agonist by hyphenated chromatographic and mass spectrometric techniques, *J Chromatogr.*, 687, 27-42.
- Prezelj, A., Obreza A., Pecar S., 2003, Abuse of clenbuterol and its detection, *Current Medicinal Chemistry*, 10, 281-290.
- Ramos, F., Cristino, A., Carrola, P., Eloy, T., Silva, J.M., Castilho, M.C., 2003, Clenbuterol food poisoning diagnosis by gas chromatography–mass spectrometric serum analysis, *Analytica Chimica Acta*, 483, 207–213.
- Rhoades, C. J., Williams, M. A., Kelsey, S. M., Newland, A. C., 2000, Monocyte–macrophage system as targets for immunomodulation by intravenous immunoglobulin, *Blood Rev.*, 14, 14-30.
- Santos, P.M., Sandrino, B., Moreira, T.F., Wohnrath, K., Nagata, N., Pessoa, C.A., 2007, Simultaneous voltammetric determination of dopamine and ascorbic acid using multivariate calibration methodology performed on a carbonpaste electrode modified by a Mer-[RuCl₃(dppb)(4-pic)] complex. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 18, 93-99.
- Say, R., Ersöz, A., Hür, D., Yılmaz, F., Denizli, A., Özcan, A. A., v.d., 2009, Photosensitive Aminoacid-Monomer Linkage and Bioconjugation Applications in Life Sciences and Biotechnology.
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., 1990, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Editorial Muscling in on clenbuterol. *Lancet*. 1992 Aug 15; 340-403.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. 1998, Enstrümantal analiz ilkeleri, V. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara, s.849.
- Sokalski, T., Zwickl, T., Bakker, E, Pretsch, E., 1999, Lowering the detection limit of solvent polymeric ion-selective electrodes, 1. modeling the influence of steady-state ion fluxes, Anal. Chem., 71, 1204-1209.
- Stetter, J. R., Penrose W. R., 2002, Sensors update, 10, p.18
- Svancara, I.,Vytras, K., Kalcher, K., Walcarius, A., Wang, J., 2008, Carbonpaste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbonpaste in electrochemistry and electroanalysis, Electroanalysis, Vol. 21, 7-28.
- Şanlı, Y., 1988, Veteriner farmakoloji, AÜ Vet. Fak. Yayınları, No:412, Ankara, 81-84, 172-176.
- Şanlı, Y.,1984, Hayvansal besinlerde antibiyotik kalıntıları ve yarattıkları sağlık sakıncaları, Bilim Teknik Dergisi, TÜBİTAK Yayınları, 17, 29-31.
- Şener, S., 1994, Anabolik ajanlar. Türkiye'de Veteriner ilaçları, üretimi, pazarlanması, güvenli kullanımı ve kalıntı sorunları sempozyumu, Ankara, 62-75.
- Telefoncu, A., 1999, Enzimoloji, İmmobilize Enzimler, Ege Üniversitesi, İzmir, Bölüm 9, 193-243.
- Temur, E., 2010, Bakteri tayini için nanopartikül tabanlı sensör geliştirilmesi, Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Teng, N.N., Lam, K.S., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7308-7312.
- The Merck Veterinary Manual. Growth Promotants. Eighth Edition, Merck&Co., Inc. Whitehouse Station, NJ, USA, 1858-1861, 1998.
- Thevenot, D., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, S., 1999, Electrochemical Biosensors: Recommended definitions and classification (Technical report), Pure Appl. Chem., Vol.71(12), 2333-2348.
- Thomson, C.A., Sporns, P., 1995, Direct ELISAs for sülfathiazole in milk and honey with special emphasis on enzyme conjugate preparation, Jornal Food Sci., 60, 409-414.
- Threlfall, E.J., Frost, J.A., Ward, L.R., Rowe, B., 1994, Epidemic in cattle and humans of Salmonella typhimurium DT104 with chromosomally integrated drug resistance, Veterinary Record, 134, 577.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tmaz, H.S.,1992, Türkiye' de veteriner ilaçları üretimi ve yasal denetimi. Seminer Notları.A.Ü. Vet. Fak., Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Tural, H., Ertaş, F.N., Gökçel, H. 2006, Enstrümental analiz ve elektroanalitik yöntemler, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, s.339.
- Turner N.D., Greene L.W., Byers F.W., Kenison D.C., 1995, Influence of incremental zeranol implant doses on the chemical and physical characteristics of third metacarpal bone and chemical composition of liver and soft tissues from feedlot steers. *J. Anim. Sci.*, 73, 1-8.
- Uğur, M., 1978, Hayvan beslemede antibiyotiklerin kullanılmasından doğan zararlar dikkate alınarak uygulanan mikrobiyolojik inhibitör maddelerinin saptama metotları, İ.Ü. Vet. Fak. Dergisi, 4, 87-97.
- Umezawa, Y.,Umezawa, K., Sato, H., 1995, Selectivity coefficients for ion selective electrodes: Recommended methods for reporting logK values (IUPAC Technical Report), *Pure App. Chem.*, 67, 507-518.
- Vo-Dihn, T., Cullum B., 2000, Biosensors and biochips: Advances in biological and medical diagnostic, *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, Vol.366, 540-551.
- Wang, J., 2006, *Analytical Electrochemistry*. 3rd Ed. Wiley-VCH, New Jersey, USA.
- Wang, J., Einarsson, C., Murphy, C., Parini, P., Björkhem, I., Gafvels, M., Eggertsen, G., 2006, Studies on LXR- and FXR-mediated effects on cholesterol homeostasis in normal and cholic acid-depleted mice. *Journal of Lipid Research*, 47, 421-430.
- Webb, J., Taylor, C.E., 1990, Antibiotic and sulfanamide residues in meat implications for human health , *J. Food. Protec.*, 53, 178-185.
- Winter, G., Milstein, C., 1991, *Nature*, 349, 293-299.
- Yao, X., Yan, P., Tang, Q., Deng, A., Li, J., 2013, Quantum dots based electrochemiluminescent immunosensor by coupling enzymatic amplification for ultrasensitive detection of clenbuterol, *Analytica Chimica Acta*, 798, 82-88.
- Zhan, P., Du, X., Gan, N., Lin, S., Cao, Y., 2013, Amperometric immunosensor for determination of clenbuterol based on enzyme-antibody coimmobilized ZrO₂ nano probes as signal tag, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 41, 6, 828-834.