

**T.C**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FENOTİYAZİN TÜRÜ BOYAR MADDELERLE**  
**MODİFİYE CAMSI KARBON ELEKTROT**  
**KULLANILARAK NADH'İN**  
**FOTOELEKTROKATALİTİK YÜKSELTGENMESİ**

**Burcu BAYRAK**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Tezin Sunulduğu Tarih: 30/07/2010**


**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Yusuf DİLGİN**

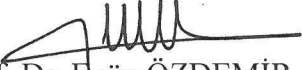
**ÇANAKKALE**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU


BURCU BAYRAK tarafından DOÇ. DR. YUSUF DİLGİN yönetiminde hazırlanan “FENOTİYAZİN TÜRÜ BOYAR MADDELERLE MODİFİYE CAMSI KARBON ELEKTROT KULLANILARAK NADH'İN FOTOELEKTROKATALİTİK YÜKSELTGENMESİ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Doç. Dr. Yusuf DİLGİN

Danışman

  
Prof. Dr. Eyüp ÖZDEMİR

Jüri Üyesi

  
Doç. Dr. H. İsmet GÖKÇEL

Jüri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 30/07/2010

Prof. Dr. İsmail TARHAN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi TÜBİTAK tarafından TBAG 107T572 nolu projeden desteklenmiştir.

## **İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI**

**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Burcu BAYRAK

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında hem bilimsel hem de manevi yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, araştırmalarım boyunca görüş ve önerilerinden yararlandığım, her konuda fikrine saygı duyduğum, yüksek lisans eğitimimde çok emeği bulunan saygıdeğer danışman hocam sayın Doç. Dr. Yusuf DİLGİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın başlangıcından sonuna kadar büyük yardımlarını gördüğüm, benimle sabırla çalışan arkadaşım Bensu ERTEK'e ve yardımlarından dolayı Öğr.Gör. Didem Giray DİLGİN'e teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmalara katkıda bulunan tüm değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezi 107T572 nolu proje kapsamında desteklemiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yaşanan zorlukların üstesinden beraber geldiğim, bana özgüven ve cesaret aşılayan, maddi ve manevi her zaman yanımda olan, attığım her adımda beni destekleyen çok değerli aileme teşekkür ederim.

Burcu BAYRAK

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A	Amper
ACDE	Asılı Cıva Damla Elektrot
ADH	Alkol Dehidrogenaz
ADP	Adenozin Difosfat
AgCl	Gümüş Klorür
AMP	Amperometri
ATP	Adenozin Trifosfat
Au	Altın
AzA	Azure A (Azur A)
AzB	Azure B (Azur B)
BKM	Brilliant Kresil Mavisi
C	Derişim
CFE	Cıva Film Elektrot
CME	Kimyasal Modifiye Elektrot (Chemically Modified Electrode )
CO <sub>2</sub>	Karbon Dioksit
CPE	Karbon Pasta Elektrot
CV	Döngüsel Voltammetri (Cyclic Voltammetry )
D	Difüzyon Katsayısı
DA	Dopamin
DCE	Damlayan Cıva Elektrot
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DKE	Doygun Kalomel Elektrot
DPV	Diferansiyel Puls Voltammetri
e <sup>-</sup>	Elektron
E <sup>0'</sup>	Formal Potansiyel
ΔE <sub>p</sub>	Pik Potansiyelleri Farkı
E <sub>pa</sub>	Anodik Pik Potansiyeli
E <sub>pc</sub>	Katodik Pik Potansiyeli
ECE	Elektrokimyasal-Kimyasal-Elektrokimyasal (Electrochemical Chemical Electrochemical)
FIA	Akışa Enjeksiyon Analizi (Flow Injection Analysis)
G	Grafit

GCE	Camımsı Karbon Elektrot (Glassy Carbon Electrode)
GDH	Glikoz Dehidrogenaz
GIH	Glutamat Dehidrogenaz
HCl	Hidroklorik Asit
He	Helyum
Hg	Civa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Fosforik Asit
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfirik Asit
$i_{pc}$	Katodik Pik Akımı
$i_{pa}$	Anodik Pik Akımı
KCl	Potasyum Klorür
KNO <sub>3</sub>	Potasyum Nitrat
$k_{obs}$	ikinci mertebeden hız sabiti
$k_s$	immobilize edilmiş mediyatör ile elektrot arasındaki elektron transfer hızı
LDH	Laktat Dehidrogenaz
M	Molar
$\mu A$	Mikro Amper
$\mu M$	Mikro Molar
MdM	Meldola Mavisi
Med <sub>ind</sub>	İndirgenmiş Formda Olan Mediyatör
Med <sub>yük</sub>	Yükseltgenmiş Formda Olan Mediyatör
mM	Mili Molar
MM	Metilen Mavisi
mol/L	Mol/Litre
mV	Mili Volt
mV/s	Milivolt/saniye
MY	Metilen Yeşili
MWCNT	Çok çeperli karbon nanotüp (Multi Walled Carbon Nanotube)
n	Mol Sayısı
N <sub>2</sub>	Azot
nA	Nano Amper
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NADH	NAD <sup>+</sup> 'nin indirgenmiş hali
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sodyum Dihidrojenfosfat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Disodyum Hidrojenfosfat
nm	Nanometre
NaNO <sub>3</sub>	Sodyum Nitrat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NK	Nötral Kırmızısı
NM	Nil Mavisi
nm	Nanometre
O <sub>2</sub>	Oksijen
OPG	Sıradan Pirolitik Grafit
Poli-MM/GCE	Poli Metilen Mavisi Modifiye Camımsı Karbon Elektrot
Poli-AzA/GCE	Poli Azur A Modifiye Camımsı Karbon Elektrot
PGE	Pirolitik grafit elektrot
Pt	Platin
s	Saniye
S	Substratın Yükseltgenmiş Formu
SH <sub>2</sub>	Substratın İndirgenmiş Formu
SWCNT	Tek çeperli karbon nanotüp (Single Walled Carbon Nanotube)
TM	Toludin Mavisi
TiO <sub>2</sub>	Titanyum Dioksit
UV	Ultraviyole
UV-Vis	Mor-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopisi
W	Watt
V	Volt
v	Tarama Hızı

## ÖZET

# FENOTİYAZİN TÜRÜ BOYAR MADDELERLE MODİFİYE CAMSI KARBON ELEKTROT KULLANILARAK NADH'NİN FOTOELEKTROKATALİTİK YÜKSELTGENMESİ

Burcu BAYRAK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Yusuf DİLGİN

30/07/2010, 72

Fenotiyazin Türü Boyar Maddelerle Modifiye Camısı Karbon Elektrot Kullanılarak NADH'nin Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi

Bu çalışmada, fenotiyazin türü boyar maddelerden olan metilen mavisi ve azur A olmak üzere farklı redoks mediyatörüyle elektropolimerizasyon yöntemi kullanılarak modifiye camımsı karbon elektrotlar hazırlanmış ve NADH'nin elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Her bir modifiye elektrotun hazırlanması esnasındaki destek elektrolit türü veya pH'ı, monomer derişimi, döngü sayısı ve potansiyel aralığı gibi parametreler modifiye elektrot hazırlandıktan sonra NADH'ye en iyi yanıt vereceği konum dikkate alınarak optimize edilmiştir. Hazırlanan modifiye elektrotlara tarama hızının ve destek elektrolit pH'nın etkisi ile modifiye elektrotların kararlılığı döngüsel voltammetri tekniği ile incelenmiştir.

NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi bu modifiye elektrotlar kullanılarak döngüsel voltammetri ve amperometri tekniği ile incelenmiş ve modifiye elektrotların NADH'ye iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği saptanmıştır. Aynı yöntemler kullanılarak; modifiye elektrotların yüzeyi fiber optikli bir halojen lamba ışık kaynağından elde edilen ışıkla ışıklandırılıp NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi gerçekleştirilmiş ve elektrokatalitik akımın normal ışıksız olana göre yaklaşık 1,5-2 kat arttığı sonucuna varılmıştır. Her bir modifiye elektrot için NADH derişimine karşı pik akımları hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntemle izlenmiş ve doğrusal derişim aralığı elde edilmiştir. Her bir modifiye elektrot için NADH derişimine karşı pik akımları hem



amperometrik hem de fotoamperometrik yöntemle izlenmiş ve  $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$  M arasında doğrusal derişim aralığı elde edilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Fotoelektrokatalitik Yükseltgenme; Modifiye Elektrot; NADH; Fenotiyazin türü boyar maddeler; Metilen Mavisi; Azur A; Döngüsel Voltammetri.

## ABSTRACT

### PHOTOELECTROCATALYTIC OXIDATION OF NADH USING PHENOTHIAZINE TYPE DYES MODIFIED GLASSY CARBON ELECTRODE

Burcu BAYRAK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Chair for Chemistry Thesis of Master of Science

Advisor: Assoc. Prof. Yusuf DİLGİN

30/07/2010, 72

Photoelectrocatalytic Oxidation of NADH Using Phenothiazine Type Dyes Modified  
Glassy Carbon Electrode

In this study the modified glassy carbon electrodes were prepared by electropolymerization of phenothiazine type redox dyes such as, Methylene blue and Azure A. The studies on electrocatalytic and photoelectrocatalytic oxidation of NADH using these modified electrodes were performed by using traditional voltammetric cell for cyclic voltammetry and amperometry.

The parameters during the preparation of each modified electrode such as supporting electrolyte type or its pH, monomer concentration, cycle number and potential window were optimized according to their best response toward NADH. The effect of the scan rate, pH of the supporting electrolyte on the modified electrodes and the their stability were investigated with cyclic voltammetry.

The electrocatalytic oxidation of NADH was investigated with amperometry and cyclic voltammetry methods using these modified electrodes and it was determined all of modified electrodes showed a good electrocatalytic effect on NADH.

With the same methods, when the surface of modified electrodes was illuminated by a fiber optic halogen lamp, it was concluded that the electrocatalytic oxidation current response of NADH increased about 1,5-2 times compared with that exhibited without irradiation. For each modified electrode, the concentration of NADH versus peak currents were investigated and a linear concentration range was obtained between  $1.0 \times 10^{-6}$ - $1.0 \times 10^{-3}$  M.

**Keywords:** Photoelectrocatalytic oxidation; Modified electrodes; NADH; Phenothiazine type dyes; Cyclic Voltammetry; Methylene Blue; Azure A.

TEZ SINAVI SONUÇ BELGESİ.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	x
<b>BÖLÜM 1- GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Fenotiyazin Türü Boyar Maddeler.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Voltammetrik Analiz .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1. Döngüsel Voltammetri .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Voltammetrik Hücrenin Bileşenleri .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1. Voltammetrik Kap .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.2. Destek Elektrolit.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.3. Karşılaştırma (Referans) Elektrodu.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.4. Yardımcı Elektrot.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.5. Çalışma Elektrodu.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.5.1. Kimyasal Modifiye Elektrotlar (Chemically Modified Electrodes, CME) .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3.5.2. Doğrudan Adsorpsiyonla CME Hazırlanması.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.5.3. Kovalent Bağlanmayla Hazırlanan CME'ler.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.5.4. Polimer ya da Metalik İnce Film Kaplanmasıyla Hazırlanan CME'ler (Homojen Çokkatmanlı CME'ler).....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.5.5. Kompozit Oluşumu İle Hazırlanan CME'ler (Heterojen Multi tabakalı CME'ler).....</b>	<b>13</b>
<b>1.4. Voltammetrik Analizde Temel İşlemler.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4.1. Destek Elektrolit Seçimi.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4.2. pH Ayarı.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4.3. Sıcaklık Kontrolü.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.4. Oksijen Uzaklaştırılması.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5. NADH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit).....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....</b>	<b>14</b>

1.5.2. Canlı Sistemlerdeki Rolü.....	17
1.5.3. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesi.....	19
1.5.3.1. NADH'nin Direk Elektrokimyasal Yükseltgenmesi.....	19
1.5.3.2. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesinde Redoks Mediyatörlerin Rolü.....	20
1.5.4. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesinde Kullanılan CME'ler.....	22
1.6. Fotoelektrokimya ve NADH'nin Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi.....	22
<b>BÖLÜM 2- ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>24</b>
2.1. Fenotiyazinlerle Hazırlanmış Modifiye Elektrotlar ve Analitik Uygulamaları.....	24
2.1.1. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesine Dayalı Yapılan Çalışmalar.....	24
2.1.2. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesine Dayalı Geliştirilen Biyosensör Uygulamaları.....	32
<b>BÖLÜM 3- MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>35</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	35
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	35
3.3. Yöntem.....	35
3.4. Stok NADH Çözeltisinin ( $5 \times 10^{-2}$ M) Hazırlanması.....	36
3.5. Stok Metilen Mavisi (MM) Çözeltisinin ( $1 \times 10^{-3}$ M) Hazırlanması.....	36
3.6. Stok Azur A (AzA) Çözeltisinin ( $1 \times 10^{-3}$ M) Hazırlanması.....	36
3.7. Elektropolimerizasyon Esnasında Kullanılan Destek Elektrolit Çözeltilerinin Hazırlanması.....	36
3.7.1. 0,1 M NaNO <sub>3</sub> İçeren 0,1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hazırlanması.....	36
3.7.2. 0,1 M NaNO <sub>3</sub> İçeren 0,1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hazırlanması.....	36
3.8. Fosfat Tampon ve Fosfat Çözeltilerinin Hazırlanması.....	36
3.8.1. 0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren 0,1 M NaOH Çözeltisinin Hazırlanması.....	37
3.8.2. 0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hazırlanması.....	37
3.8.3. 0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren 0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hazırlanması.....	37

<b>3.9. NADH'nin Elektrokatalitik ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesinde Kullanılan Destek Elektrolit Çözeltilisinin Hazırlanması.....</b>	<b>37</b>
<b>3.10. Poli-MM Modifiye GCE Hazırlanması.....</b>	<b>37</b>
3.10.1. En Uygun Destek Elektrolitin Belirlenmesi.....	37
3.10.2. En Uygun Monomer Derişiminin Belirlenmesi.....	37
3.10.3. En Uygun Döngü Sayısının Belirlenmesi.....	38
3.10.4. En Uygun Potansiyel Aralığının Belirlenmesi.....	38
<b>3.11. Poli-AzA Modifiye GCE Hazırlanması.....</b>	<b>38</b>
3.11.1. En Uygun Destek Elektrolitin Belirlenmesi.....	38
3.11.2. En Uygun Monomer Derişiminin Belirlenmesi.....	39
3.11.3. En Uygun Döngü Sayısının Belirlenmesi.....	39
3.11.4. En Uygun Potansiyel Aralığının Belirlenmesi.....	39
<b>3.12. Modifiye Elektrotların Karakterizasyonu.....</b>	<b>39</b>
<b>3.13. Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Elektrokatalitik Ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesinin İncelenmesi.....</b>	<b>40</b>
3.13.1. Döngüsel Voltammetri Yöntemiyle.....	40
3.13.2. Amperometrik Yöntemle.....	40
3.13.2.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi.....	40
3.13.2.2. En Uygun Potansiyelde Farklı Derişimlerde NADH'nin Elektrokatalitik ve Fotoelektrokatalitik Akım Değerlerinin Kaydedilmesi.....	40
<b>BÖLÜM 4- ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>42</b>
4.1.Modifiye Elektrotların Hazırlanması.....	42
4.2.Poli-MM Modifiye GCE.....	42
4.2.1. MM'nin Elektropolimerizasyon Mekanizması.....	49
4.3.Poli-AzA modifiye GCE.....	50
4.4.Modifiye Elektrotların Karakterizasyonu.....	54
4.5.Hazırlanan Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Elektrokatalitik Ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi.....	56
4.5.1. Döngüsel Voltammetrik Yöntemle.....	56
4.5.2.Amperometrik Yöntemle.....	59
<b>BÖLÜM 5- SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>64</b>

<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>66</b>
<b>Ekler.....</b>	<b>I</b>
<b>Çizelgeler.....</b>	<b>III</b>
<b>Şekiller.....</b>	<b>IV</b>
<b>Özgeçmiş.....</b>	<b>VIII</b>

## BÖLÜM 1

## GİRİŞ

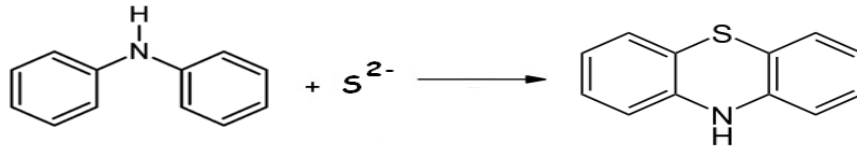
## 1.1. Fenotiyazin Türü Boyar Maddeler

Fenotiyazin türü bileşikler heterohalkalı bileşiklerin tiyazin sınıfı ile alakalı olup, yapısında kükürt ve azot içeren trisiklik aromatik halkalı bileşiklerdir. 2 ve 10 pozisyonunda ya da 3 ve 7 pozisyonlarında sübstütiye gruplar içerebilir (Karpinska ve ark., 1996). Basit ve sübstütiye fenotiyazin bileşikleri Şekil 1'de verilmiştir. Bu üç halkalı bileşiğin molekül formülü  $S(C_6H_4)_2NH$  şeklinde olup asetik asit, benzen ve eterde çözünür. Bu bileşiğin değişik türevleri ilaç olarak oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptir. 2 ve 10 pozisyonlarında sübstütiye fenotiyazin türevleri genelde antikolinerjik (nörotransmitter asetilkolini inhibe eden ilaç), antipsikotropik, antihistaminik ilaç olarak kullanılmaktadır (örneğin promazin, klorpromazin, triklorpromazin). 3 ve 7 pozisyonlarındaki sübstütiye fenotiyazinler ise analitik kimya alanında özellikle modifiye elektrot yapımı ve uygulamalarında kullanılmıştır (Karpinska ve ark., 1996).



Şekil 1. Fenotiyazinin molekül yapısı.

Fenotiyazin halkası içeren ilk bileşik olan 3-7, diaminofenazatiyonyum klorür 1876 yılında Lauth tarafından elde edilmiştir (Silberg ve ark., 2006). Daha sonra fenotiyazin 1883 yılında Bernthsen tarafından difenilamin ile sülfürün ısıtılması sonucu hazırlanmıştır. Ancak fenotiyazinin farmasötik olarak önemli olan türevleri fenotiyazinden hazırlanmamıştır (Silberg ve ark., 2006).



Şekil 2. Fenotiyazinin eldesi.

Bu tür bileşikler;

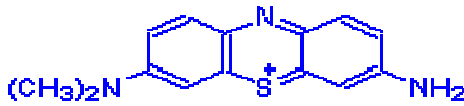
1) Tıpta birçok hastalığın tanısında ve tedavisinde; özellikle 1950’lerde tıp alanına fenotiyazin türü bileşiklerin girmesiyle bu bileşiklerin sentezi ve karakterizasyonu üzerine yoğun çalışmalar yapılmıştır.

2) Eczacılıkta; fenotiyazin grubu içeren birçok formasötik bileşiklerin sentezinde

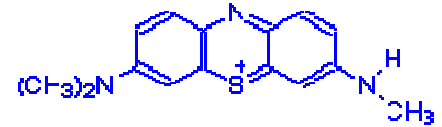
3) Sensör ve biyosensörlerde; özellikle bazı fenotiyazin grubu boyar maddeler kullanılarak birçok bileşiğin indirekt tayinlerinde, sensör ve biyosensör geliştirilmesinde kullanılması, bu bileşiklerin ne denli önemli olduğunu göstermektedir.

Fenotiyazin türü boyar maddelerin redoks medyatörü olarak oldukça sık kullanılmasının nedeni birçok bileşiğin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etki gösterme özelliğine sahip olmasındandır. Redoks medyatörü olarak kullanılan fenotiyazin türü boyar maddeler şekil-3’te verilmiştir.

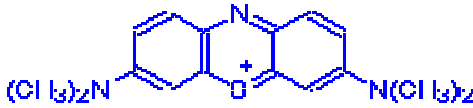
**Azure A**



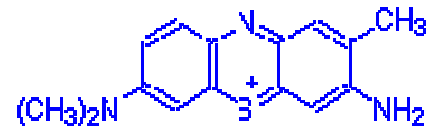
**Azure B**



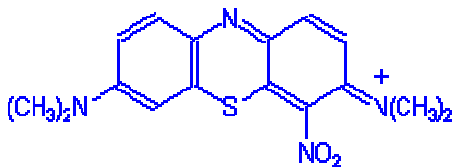
**Metilen Mavisi**



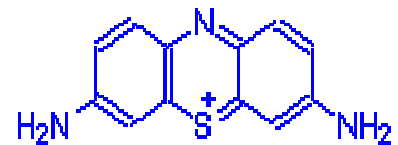
**Toludin Mavisi**



**Metilen Yeşili**



**Tiyonin**



Şekil 3. Fenotiyazin türü bazı boyar maddeler .



Bu tür boyar maddelerle modifiye elektrot hazırlanarak, askorbik asit, dopamin, epinefrin, ürik asit, NADH gibi biyolojik öneme sahip moleküllerin voltammetrik ve amperometrik tayinleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca son yıllarda bu tür modifiye elektrotlar, biyosensör çalışmalarında oldukça sık kullanılmıştır.

### **1.2. Voltammetrik Analiz**

Analizlenen çözelti bir elektrokimyasal hücrenin bir parçası olduğunda ve bu hücrenin elektrokimyasal özelliklerinin izlenmesine dayanan yöntemler ailesine Elektroanalitik Yöntemler denir (Nişli, 2001). Elektroanalitik yöntemler, incelenen elemente daha kolay uygulanması, kullanılan aygıtların ucuz olması ve genellikle kimyasal türlerin derişimini değil etkin derişimini belirtmesi gibi üstünlükler taşır. Elektroanalitik yöntemlerden özellikle voltammetrik ve amperometrik yöntemler uygulamada oldukça çok kullanılmıştır.

**Voltammetri;** elektrolit çözeltisine daldırılmış çalışma elektrodunun polarize olduğu koşullarda zamanla düzenli olarak değiştirilen potansiyele bağımlı değişen akımın incelendiği elektroanalitik yöntemin adıdır (Nişli, 2001). Akım gerilim eğrileri  $i=f(E)$ ; iki ya da üç elektrotlu sistemlerle elde edilir (Tural ve ark., 2006). Voltammetrik yöntem, kullanılan akım türlerine ve çalışma elektroduna bağılı olarak isimlendirilir. Voltammetrik tekniklerin sınıflandırılması Çizelge 1.1’de verilmiştir (Nişli, 2001).

Voltammetride çalışma elektrodu olarak polarizasyonu arttırmak için yüzey alanı birkaç  $mm^2$  olan mikroelektrotlar kullanılır. Mikroelektrot olarak damlayan cıva elektrodunun (DCE) kullanıldığı voltammetrik yöntem polarografi olarak adlandırılır (Nişli, 2001). Bu elektrodun özellikle sürekli yenilenen yüzeye ve geniş bir katodik çalışma potansiyel aralığına sahip olma üstünlükleriyle kullanıma sunulmasının ardından elektroanalitik kimyada önemli gelişmeler yaşanmıştır. Voltametrinin tarihsel gelişiminde polarografi tekniğine dayanılarak 1922 yılında Çek bilim adamı Heyrovski tarafından düşünülp, geliştirilmiş ve bu buluş kendisine 1959 yılında Kimya Nobel Ödülünü kazandırmıştır (Nişli, 2001).

**Amperometri;** sabit potansiyelde akım değişiminin ölçülmesi üzerine kurulu elektroanalitik yöntem ise amperometri denir (Tural ve ark., 2006).

Çizelge 1.1. Voltammetrik tekniklerin sınıflandırılması

TEKNİK	ÇALIŞMA ELKTRODU	BELİRTME SINIRI (M)	YANIT ŞEKLİ
Doğru Akım Polarografisi	DCE	$10^{-5}$	DALGA
Normal Puls Polarografisi	DCE	$5 \cdot 10^{-7}$	DALGA
Diferansiyel Puls Polarografisi	DCE	$10^{-8}$	PİK
Diferansiyel Puls Voltammetrisi	Katı Elektrot	$5 \cdot 10^{-7}$	PİK
Kare Dalga Polarografi	DCE	$10^{-8}$	PİK
Alternatif Akım Polarografisi	DCE	$5 \cdot 10^{-7}$	PİK
Kronoamperometri	Durgun Elektrot	$10^{-5}$	ÜSTEL
Döngüsel Voltammetri	Durgun Elektrot	$10^{-5}$	PİK
Sıyırma Voltammetrisi	ACDE, CFE	$10^{-10}$	PİK
Adsorptif Sıyırma Voltammetrisi	ACDE	$10^{-10}$	PİK
Adsorptif Sıyırma Voltammetrisi	Katı Elektrot	$10^{-9}$	PİK
Adsorptif Katalitik Sıyırma Voltammetrisi	ACDE	$10^{-12}$	PİK

\*DCE: Damlayan Civa Elektrot, ACDE: Asılı Civa Damla Elektrot, CFE: Civa Film Elektrot

**1.2.1. Döngüsel Voltammetri**

Günümüzde varolan potansiyel tarama tekniklerinden özellikle Döngüsel Voltammetri (Cyclic Voltammetry, CV), birçok mekanizma türü için kinetik parametrelerin tayin edilmesine elverişli olduğundan, çoğu araştırmada ilk başvurulan tekniktir (Nişli, 2002). Bu teknik yardımıyla bir anlamda elektrokimyasal spektrum denilebilecek ve kimyasal proseslerin gerçekleştiği potansiyelleri gösteren bir voltamogram hızlı bir şekilde elde edilebilir. Bu yolla tarama hızına bağımlılıktan faydalanılarak, eşleşmiş homojen tepkimelerin etkisi kolayca aydınlatılabilir ve adsorbsiyon gibi diğer eşlik edebilecek olaylar da tanımlanabilir. Bu nedenle bir sistem ilk kez incelenirken, kinetik verilerin kesin tayininde daha iyi teknikler bulunsa da, genelde döngüsel voltammetri yeğlenir. CV yönteminde, uygulanan potansiyel önce bir yönde, sonra ters yönde taranırken akım ölçülür. Bir CV deneyinde tek bir tam döngü, bir yarım döngü veya birçok döngüler kullanılabilir (Nişli, 2002).

Bir CV deneyinde, küçük boyutlu durgun bir elektrot, durgun bir çözeltide, belli bir potansiyel değişimi uygulanarak, bir akım sinyali vermesi sağlanır (Skoog ve ark., 2004). Üçgen dalga formu, ileri ve bunun tersi yöndeki potansiyel taramasını temsil eder. Örneğin, potansiyel, önce +0,8 V'dan -0,15 V'a (standart kalomel elektroda karşı) değiştirilir, sonra tarama yönü terse çevrilip potansiyelin başlangıçtaki +0,8 V değerine geldiği yerde, tarama durdurulur. Tarama hızı her iki yönde de aynıdır. Çoğu zaman bu döngü defalarca tekrarlanır. Taramanın ters döndüğü potansiyellere dönüş potansiyeli denir. Belli bir deneyde, dönüş potansiyelleri, bir veya daha çok sayıda türün difüzyon kontrollü yükseltgenmesini veya indirgenmesini gözlemeyi mümkün kılacak şekilde seçilir. İlk taramanın yönü, numunenin bileşimine bağlı olarak, negatif yönde olabileceği gibi, bunun tersi de olabilir. Daha negatif potansiyellere doğru gidilerek tarama yapılıyorsa, buna ileri tarama; diğer yöndekine de geri tarama denir. Tarama süreleri 1 ms veya daha kısa değerlerden başlar; 100 s veya daha uzun değerlere çıkabilir.

Döngüsel voltammogramda önemli parametreler, katodik pik potansiyeli ( $E_{pc}$ ), anodik pik potansiyeli ( $E_{pa}$ ), katodik pik akımı ( $i_{pc}$ ) ve anodik pik akımıdır ( $i_{pa}$ ). Tersinir bir elektrot reaksiyonunda, anodik ve katodik pik akımları mutlak değerce yaklaşık eşit, işaretce zıttır. Yine tersinir bir elektrot reaksiyonu için, 25<sup>0</sup>C'da, pik potansiyelleri farkının ( $\Delta E_p$ ),

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 0,059/n \quad (1.1)$$

olması beklenir. Burada  $n$ , yarı-reaksiyonda kullanılan elektron sayısıdır. Elektron aktarım kinetiği çok yavaş olduğu için, tersinmezlik varsa,  $\Delta E_p$  beklenen değerden daha büyük çıkar. Bir elektron aktarım reaksiyonu, düşük tarama hızlarında tersinir gibi görülürken, tarama hızı büyüdükçe  $\Delta E_p$  büyüyorsa, bu sağlam bir tersinmezlik işaretidir. Bu yüzden, elektrot aktarım kinetiğinin yavaş olup olmadığını gözlemek ve hız sabitlerini elde etmek için farklı tarama hızlarındaki  $\Delta E_p$  değerleri bulunur (Skoog ve ark., 2004).

Nicel bilgi için, Randles-Sevcik eşitliği kullanılır.  $25^{\circ}\text{C}$ 'da bu eşitlik aşağıdaki gibidir;

$$I_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (1.2)$$

Burada  $i_p$ , pik akımı (Amper);  $A$ , elektrot yüzey alanı ( $\text{cm}^2$ );  $D$  difüzyon katsayısı ( $\text{cm}^2/\text{s}$ );  $C$ , derişim ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ) ve  $v$ , tarama hızıdır ( $\text{V}/\text{s}$ ). CV, derişim, elektrot yüzey alanı ve tarama hızı biliniyorsa, difüzyon katsayılarını tayin için bir yoldur.

CV'nin esas kullanım alanı, farklı şartlar altında elektrokimyasal süreçlerle ilgili nitel bilgi sağlamaktır. CV, organik ve anorganik kimyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Elektroaktif türler içeren sistemleri incelemek için akla gelen ilk teknik budur. Çoğu zaman indirgenme/yükseltgenme reaksiyonlarındaki ara ürünlerin döngüsel voltammogramlarla yakalanması mümkün olmaktadır. Bu yöntemde, çoğu zaman platin elektrotlar kullanılır. Negatif potansiyeller bölgesinde, cıva film elektrotlar tercih edilebilir. Diğer yaygın çalışma elektrotları arasında, camımsı karbon, altın grafit ve karbon pasta elektrotlar (Carbon paste electrode, CPE) sayılabilir. Kimyasal olarak modifiye elektrotlar (Chemically modified electrodes, CMEs) da sıkça kullanılmaktadır (Skoog ve ark., 2004).

### **1.3. Voltammetrik Hücrenin Bileşenleri**

#### **1.3.1. Voltammetrik Kap**

Voltammetrik analizler cam, kuartz veya teflon kaplarda yürütülür. Kapın yapıldığı malzeme kirlenme ve adsorbsiyon yanlıgılarının en az olduğu maddelerden seçilir. Voltammetrik ölçüm hücresi çalışma, karşılaştırma ve yardımcı elektrotları ve azot gazı girişini içerir (Nişli, 2001).

#### **1.3.2. Destek Elektrolit**

Voltammetride elde edilen akımın yalnız difüzyon kontrollü olabilmesi için ortama iyonik göçü önlemek üzere destek elektrolit eklenir. Bu amaçla ortama KCl,  $\text{KNO}_3$  gibi bir inorganik tuz, bir mineral asidi veya tuz katılabilir. Sitrik asit / sitrat veya asetik asit /

asetat gibi tampon sistemleri de pH kontrolünün gerektiği konularda destek elektrolit olarak kullanılabilir (Nişli, 2001).

### **1.3.3. Karşılaştırma (Referans) Elektrodu**

Bu amaçla polarize olmayan metal-metal iyonu elektrotları kullanılır. Bu elektrotlar, bilinen ve sabit bir potansiyel değeri sağlayan ve incelenen çözeltinin bileşiminden etkilenmeyen elektrotlardır. Sadece düşük akım şiddetlerinde polarlanmazlar, akım şiddeti arttıkça ideal konumlarından saparlar. En çok kullanılanlar kalomel ve Ag/AgCl elektrotlardır. Bu elektrotlardan anodik akım geçtiğinde metaller yükseltgenir ve ortamdaki aşırı Cl<sup>-</sup> ile çökeldiklerinden, elektrot yüzeyindeki derişimleri değişmez ve böylece potansiyelleri akımdan bağımsız olur. Bu elektrotlarda katodik akım geçtiğinde ise çözünürlükten gelen metal iyonları indirgenir, elektrot yüzeyinde çökelek ayrışarak tekrar aynı denge düzeyinde metal iyonu oluşturur, böylece yine potansiyeli değişmez kalır (Tural ve ark., 2006).

### **1.3.4. Yardımcı Elektrot**

İki elektrotlu sistemlerdeki polarlanmayan elektrot, üzerinden akım geçtiği için, yüksek akımlarda polarlanır. Ayrıca eğer çözelti direnci yüksek ise bu direnci yenmek için gerekli olan potansiyel ( $iR$ ) önemli bir düzeye çıkar. Bu iki nedenden dolayı çalışma elektrodunun polarizasyon potansiyeli yanlış algılanır. Bunun sonucu olarak  $i=f(E)$  eğrileri yatıklaşırlar ve belirli bir noktadan sonra basamak ya da pikler kaybolur. Bu sorun, sistemde üçüncü bir elektrot kullanarak çözümlenir. Akım, çalışma elektrotu ile yardımcı elektrot ikilisinden geçirilir ve çalışma elektrotunun potansiyeli karşılaştırma elektroduna karşı sıfır akım altında saptanır. Akım yardımcı elektrottan geçtiği için soy metal olmaları gerekir bu nedenle daha çok platin, grafit, tantal ya da tungsten kullanılır (Tural ve ark., 2006).

### **1.3.5. Çalışma Elektrodu**

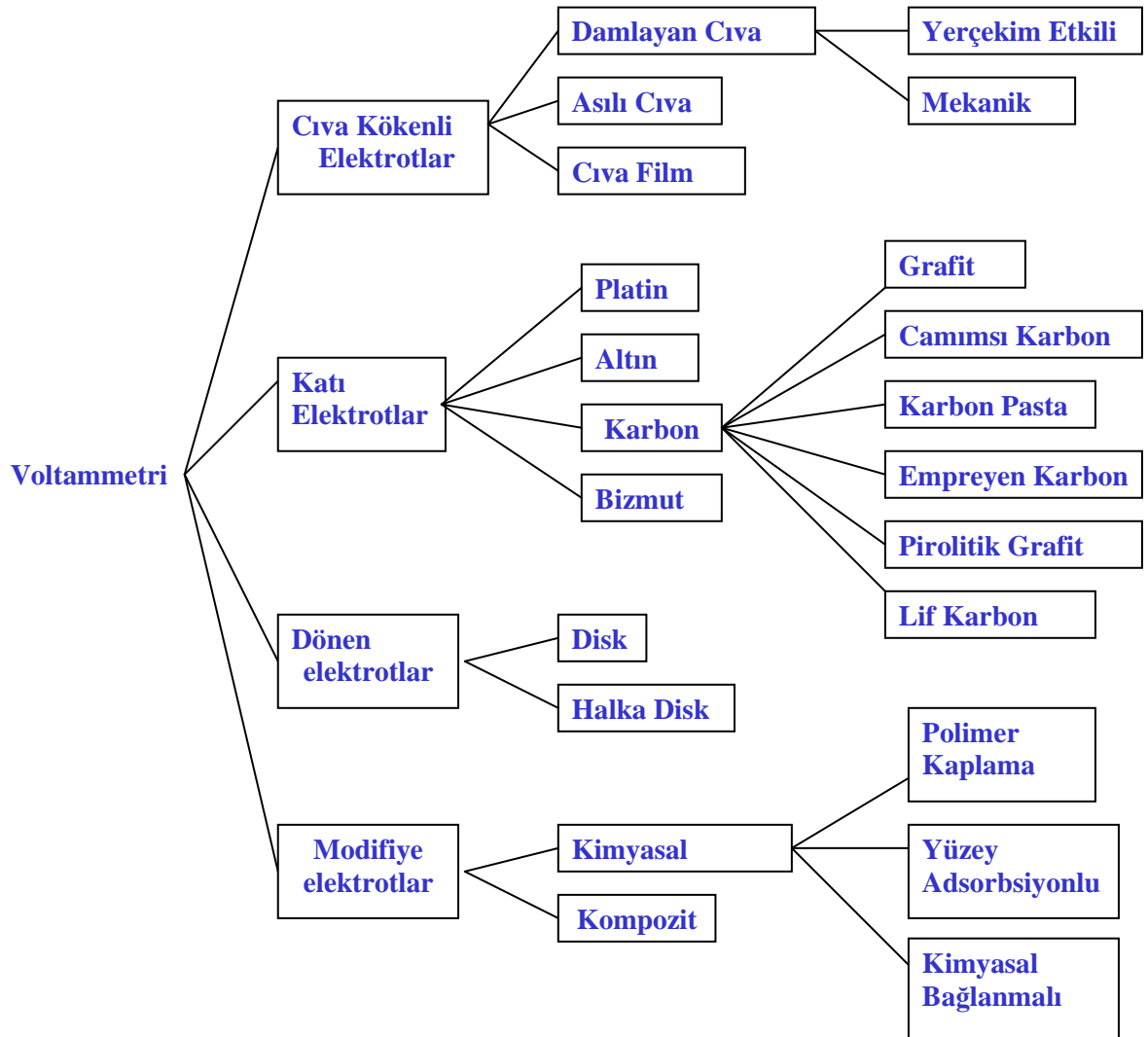
Çalışma elektrotları akım-gerilim-derişim ilişkilerinin incelendiği küçük yüzey alanlı ( $1\text{cm}^2$ 'den küçük) polarize elektrotlardır. Voltammetride kullanılan elektrotların hem kimyasal hem de elektrokimyasal özellikleri önemlidir (Tural ve ark., 2006). Bu nedenle voltammetride sınırlı sayıda polarlanabilen elektrot kullanılır. Bunlar şekil 4'te guplandırılmış olan cıva(sıvı), platin, altın, bizmut ve karbon kökenli katı elektrotlar ile modifiye elektrotlardır. Durağan ya da dödürülerek kullanılabilen bu elektrotların her birinin potansiyel çalışma aralığı farklıdır. Bu aralık elektrot türüne bağlı olduğu gibi,

çözücüye, kullanılan elektrolit türüne ve pH'a da bağlıdır. Katodik sınırı, hidrojenin oluşumu ya da destek elektrolitin indirgenmesi; anodik sınırı ise elektrot meteryalinin ya da çözücünün yükseltgenmesi belirler (Tural ve ark., 2006).

Asitlik arttıkça katodik bölge daralır. Elektrolit metal iyonu ile kompleks oluşturan iyon ya da molekül içeriyorsa, metal elektrotlara ilişkin anodik bölgede daralma gözlenir. Örneğin Pt, Hg, Au gibi elektrotların çalışma aralığı, halojenürler varlığında, halojenürlerin bu metal iyonlarıyla kompleks oluşturmaları nedeniyle daralmaktadır.

Voltammetrik metodun performansı, çalışma elektrodunun materyali tarafından güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Çalışma elektrodunun hem geometrisi hem de bileşimi düşünülmelidir. Çalışma elektrodu yüksek sinyal-ses karakteristiği ve tekrarlanabilir yanıt sağlamalıdır (Tural ve ark., 2006).

Voltammetride kullanılan çalışma elektrotları Şekil 4'te özetlenmiştir.



Şekil 4. Voltammetride kullanılan çalışma elektrotları (Tural ve ark., 2006).

**1.3.5.1. Kimyasal Modifiye Elektrotlar (Chemically Modified Electrodes, CME)**

Voltammetrik yöntemlerde kullanılan katı elektrotların kullanımı oldukça kolaydır, ancak adsorpsiyondan kaynaklanan bir takım problemleride beraberinde getirmektedir. Elektrot, girişimci elektroaktif bileşiklerin karışımını içeren karmaşık bir matris ortamına uygulandığında adsorpsiyon doğruluğu ve duyarlılığı oldukça düşürür. Bunu önlemek için elektrot yüzey modifikasyonu yapılmıştır. Yüzey modifikasyonu duyarlılık, doğruluk ve önyayırma ve zenginleştirme işlemleri için en etkili prosedür olup, elektrokimyasal metotlarla birçok analitin tayin edilmesine olanak sağlamaktadır. Elektrot yüzeyi fiziksel, kimyasal veya biyolojik modifikasyonla daha duyarlı hale getirilebilir. Kimyasal modifiye elektrotlar (Chemically modified electrodes, CME), son 20-25 yıldır en çok çalışılan konulardan biridir. 1997’de IUPAC’ın yaptığı tanıma göre “iletken ya da yarı iletken malzemeden yapılmış bir elektrodun, seçicilik gösteren mono moleküler, iyonik ya da polimerik bir kimyasal modifiye edici filmle kaplanması ve faradaik tepkimeler veya potansiyel farkı ile filmde kimyasal, elektrokimyasal ve optik özelliklerin oluşması” biçiminde verilmiştir (IUPAC, 1997).

Genelde elektrot yüzeyinin modifikasyonu i) elektrot yüzeyine taşınma özelliklerini (girişimcileri gidermek için bariyerler, analitin zenginleştirilmesi, iyon değişimi gibi), ii) elektrot yüzeyindeki kimyasal tepkimeleri (ligand eklenmesiyle önzenginleştirme tepkimeleri, enzim rekaisyonları) iii) elektron transfer özelliklerini (elektron transferini geliştirmek için elektrokatalizörler) etkilemeyi amaçlamaktadır (Symth ve Vos, 1992).

Özet olarak voltammetri ve potansiyometride kullanılan CME’ler yalın elektrot yüzeyine kimyasal grupların bağdaştırılması ile yapılır. Duyarlılığı, seçiciliği artırır, elektroaktif türün yükseltgenme ya da indirgenme potansiyelini olayı kolaylaştırıcı yönde değiştirir. Metal iyonlarının zenginleştirilmesinde ya da iyon değişme özelliği ile elektroaktif bileşiklerin saptanmasında da kullanılmaktadır (Nişli, 2001).

Modifiye edici malzemeler organik veya inorganik olabilir. Organik madde olarak genelde polimerler kullanılmasına karşılık inorganik madde olarak da ligandlar, kompleksler ya da metal oksitleri kullanılır (Zen ve ark., 2003).

Genel olarak CME’ler 4 yolla hazırlanmıştır:

- 1- Elektrot yüzeyini modifiye edecek ortama daldırarak doğrudan adsorbsiyonla
- 2- Modifiye edicinin elektrot yüzeyine kovalent bağla bağlanması ile
- 3- Elektrot yüzeyinin polimer ya da metalik ince filmle kaplanması ile (elektropolimerizasyon)

4- Az çözünen modifiye maddenin iletken elektrot meteryali ile karıştırılarak kompozit oluşturması ile hazırlanmıştır (Nişli, 2001).

Bu dört yöntem Murray ve arkadaşları tarafından Çizelge 1.2'de (Murray ve ark., 1987), Zen ve Arkadaşları tarafından Şekil 5'te (Zen ve ark., 2003) kapsamlı bir şekilde özetlenmiştir.

Çizelge 1.2. Elektrot modifikasyon yöntemleri (Murray ve ark., 1987)

Tekmoleküler tabaka

Reaktiflerin kimyasal sorpsiyonu

- Platin yüzeyinde
- Karbon yüzeyinde
- Civa yüzeyinde
- Au yüzeyinde

Elektrot ve elektroaktif reaktif arasında kovalent bağ oluşumu

- Metal oksit yüzeylerinde
- Karbon yüzeylerinde
- Yarıiletkenlerde
- Elektroaktif, kiral maddeler

Çokmoleküler tabakalar,

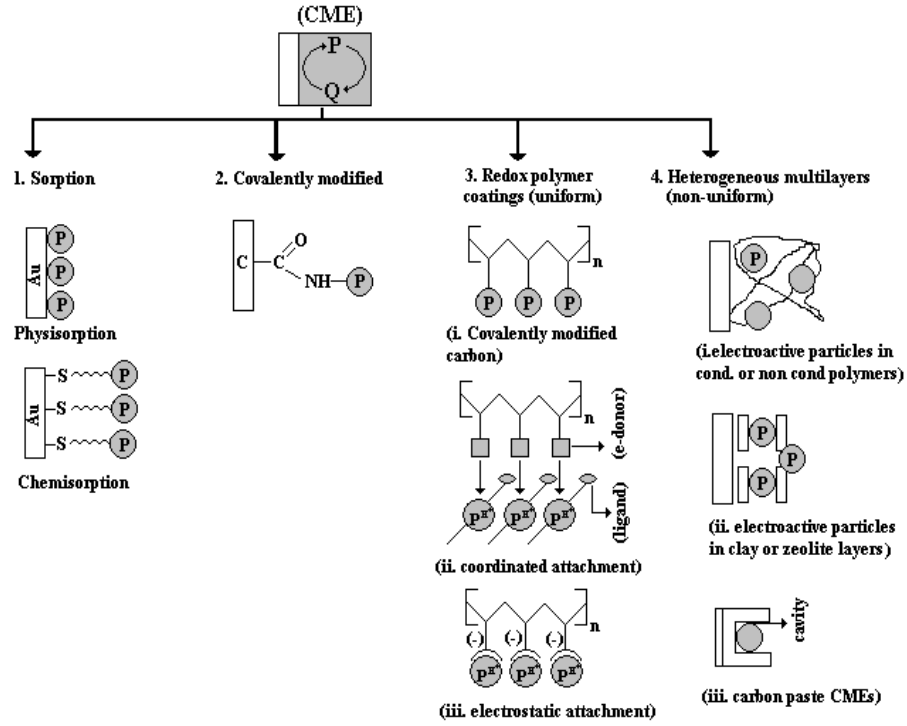
Elektrot yüzeyine polimer film kaplama

- redoks polimerler
- iyon değişimi-elektrostatik olarak tutuklama
- Elektronik olarak iletken polimerler
- İyonik olarak iletken polimerler
- Taç eterler veya kompleksleştirici reaktifler
- Elektroaktif kiral polimerler

Heterojen Çokmoleküler tabakalar

- Karbon pasta ile modifiye edici maddenin karışımı
- Kil modifiye elektrotlar
- Zeolit modifiye elektrotlar
- Elektroaktif polimerlerde elektroaktif partiküller





Şekil 5. Farklı yollarla hazırlanan CME'lerin şematik gösterimi (Zen ve ark., 2003).

### 1.3.5.2. Doğrudan Adsorpsiyonla CME Hazırlanması

Adsorpsiyon elektrot modifikasyonunda başvurulan en eski prosedürdür. İlk kez Lane ve Hubbard tarafından platin elektrotlar için çalışılmıştır; olefinler Pt üzerine adsorbe olduğunda Pt-C bağlarının varlığını göstermişlerdir. Adsorpsiyon prosesi, fiziksel yerleşme ve kemisorpsiyon olarak uygulanabilir. Sorpsiyon CME hazırlamak için, saf organik veya organometalik kompleksler cam karbon(VC), grafit(G), sıradan pirolitik grafit(OPG) gibi karbon bazlar üzerine adsorbe edilirler (Nişli, 2001).

Bu sistemler analitik uygulamalar için kullanışlı olmasına rağmen, bu tarz elektrotlar için kararlılık her zaman kritik bir problem olmuştur. Bu prosesle, elektrot yüzeyine güçlü ve tersinmez bir şekilde adsorbe olan ve genellikle mono tabaka veren ince bir film oluşturulmaktadır. Genel metotta, elektrot modifiye edici maddenin çözeltisinde belli bir süre tutulmaktadır. Daha sonra elektrot saf su ile yıkayıp adsorpsiyon oluşumu voltammetrik yöntemle saptanır. Bu elektrot modifikasyonu kolay görünse de birtakım dezavantajları vardır. En önemli dezavantajı elektrot yüzeyinde adsorpsiyon için yarışan elektroaktif bileşenlerin elektrot prosesini etkilemesidir (Nişli, 2001).

**1.3.5.3. Kovalent Bağlanmayla Hazırlanan CME'ler**

Kolay yüzey modifikasyonu ve fonksiyonel grup bağlanması bu yaklaşımın temel avantajlarıdır. Elektrot yüzeyinin spesifik bir fonksiyonel grupla modifikasyonu CME'nin hazırlanmasına has bir durumdur. Kovalent bağlama, elektrot yüzeyinin birçok mono tabaka tarafından kaplanmasına öncülük eder. Elektrot yüzeyi modifiye edici madde ile kovalent bağlanmaya girer. İki çeşit kovalent bağlanma vardır bunlar; silanizasyon ve direk bağlanmadır (Nişli, 2001).

Silanizasyon, tarihte ilk kullanılan yüzey modifiye etme tekniğidir. Bu, elektrot materyalinin altında birden üçe kadar bağ oluşturmak için trialkoksi veya triklorosilanlarla reaksiyona giren yüzey hidroksi veya oksit gruplarının oluşumunu içermektedir. Organosilanlar hidroksil grupları içeren yüzeyleri modifiye etmede kullanılırlar (Symth ve Vos; 1992).

Diğer bir alternatif yaklaşımda, yüzey karboksilik asit grupları birkaç yöntem kullanılarak oluşturulmaktadır, bunların en popüler olanı elektrot yüzeyinin termal ve radyo frekanslı plazma ile önişleme tabi tutulmasıdır. Böyle reaktif gruplar ya direkt olarak yada asit klorürlere dönüşerek CME'lerin hazırlanması için yararlı sentetik yollar sağlar. Elektrot yüzeyine tutturulmuş asit klorürleri amin grupları ile kondensasyon tepkimesi için kullanılabilir. Böylece geçiş metalleri kompleksleri oluşturan amin gruplarının elektrot yüzeyine tutturulması sağlanmış olur (Symth ve Vos, 1992).

Direk bağlanmada, karbon ve platin gibi materyaller elektrot yüzeyine direk bağlanmaktadır.

**1.3.5.4. Polimer ya da Metalik İnce Film Kaplanmasıyla Hazırlanan CME'ler (Homojen Çokkatmanlı CME'ler)**

Elektrot yüzeyinde polimer ya da metal, ince film halinde oluşturulur ve elektrot yüzeyi kaplanır. Bu tür yüzey kaplamasının mekanik ve kimyasal kararlılığı, duyarlılığı, seçiciliği daha iyidir. Polimer filmler iletken olsun olmasın organik inorganik ve organometalik yapıda olabilir. Polimerler modifiye etme malzemesi olarak doğrudan kendisi etkin olduğu gibi, modifiye eden için destek (tutturucu) niteliğinde de kullanılır. Bu son durumda düşük ve kararlı zemin akımı oluşur (Nişli, 2001).

Elektrot yüzeyinde polimer oluşumu; elektrodu daldırma ile; modifiye eden çözeltiyi elektrot yüzeyine damlatıp buharlaştırma ile; elektrolitik biriktirme ya da elektropolimerleştirme ile sağlanır. Polimer filmlerin tekli katman halinden çokluya ardışık katmanlar halinde geçişinin elektrostatik etkileşime dayalı olduğu bildirilmiştir. İnce bir polimer film katı elektrot yüzeyinde katodik ya da anodik elektrolitik biriktirme ile elde

edilmiştir. İyonsal nitelikli polimerlerin oluşumu kullanılan çözeltilerdeki çözünürlüklerine dayanır (Nişli 2001).

Elektropolimerleşmede polimer, elektrot ürünü olarak elektrot çevresinde radikalik basamak üzerinden giderek elde edilir.(örn. Pirolün yükseltgenmesi ile polimerleşmesi) Radikal oluşum hızı potansiyel ve akım kontrol edilerek sağlanır. Ürünün çözücü ortamında çözünürlüğü azdır; katmanın yapısı, karakteristikleri biriktirme hızına bağlıdır. Akım-zaman verileri film kalınlığı ve büyümesinde önemli etkidir (Nişli, 2001).

#### **1.3.5.5. Kompozit Oluşumu İle Hazırlanan CME'ler (Heterojen Çokkatmanlı CME'ler)**

Karbon temelli elektrotlarda özellikle CPE modifiye edilmesinde en çok kullanılan yöntemdir. Çoğunlukla elektron transfer işlemi kolaylaştıran modifiye malzeme, karbon tanecikleri ile birleştirilerek kompozit yapı oluşturulur. Heterojen çokkatmanlı CME'lerde, katı destekler uniform olmayan bir yolla medyatör sistemleriyle birleştirilmiştir. Grafit/bağlayıcı pasta ile redoks medyatörünün basit karışımıyla CME hazırlamada CPE en elverişli materyallerden biridir. Bu prosedürle, enzimatik kil, zeolit, zirkonyum fosfat ve silika ile modifiye edilmiş kompozit elektrotlar hazırlanabilir (Walcarius, 1998 ve 1999; Nauratilova ve Kula, 2003; Zen ve ark., 2003).

### **1.4. Voltammetrik Analizde Temel İşlemler**

#### **1.4.1. Destek Elektrolit Seçimi**

Voltammetrik tekniklerde kullanılan destek elektrolit yeterince saf olmalıdır. Eğer safsızlık varsa, bunların derişimi analit derişiminin %1'ini geçmemelidir. Aksi halde saflaştırma işlemlerinden biri uygulanmalıdır. Örneğin cıva katoda ön elektroliz yapılabilir ya da MnO<sub>2</sub> gibi metal iyonlarını adsorplayıcı katılarak kullanılabilir. Ayrıca destek elektrolit çalışma elektrodunun çalışma potansiyel aralığını daraltır nitelikte olmamalıdır. Başka bir deyişle destek elektrolit anyonu elektrodun metal iyonu ile kompleks oluşturmamalı, kationu veya çözücü indirgenerek katodik bölgeyi daraltmamalıdır (Tural ve ark., 2006).

Bunların dışında eğer örnekte birden fazla analit varsa ve bunlardan bazılarının voltammetrik dalgaları çakışiyorsa destek elektrolit bu çakışmayı giderici biçimde olmalıdır.

#### **1.4.2. pH ayarı**

Organik moleküllerin elektrot tepkimelerinin çoğunda proton görev alır. Bu nedenle akım-potansiyel ilişkileri pH'a bağımlı olur. Voltammetrik çalışmalarda bu bağımlılığın oluşturacağı yanlışlıklardan kurtulmak için çözeltilerin tamponlanması gerekir. Seçilen

tampon çalışma penceresini daraltmayacak nitelikte olmalıdır. Çalışma potansiyel aralığı katodik yönde geliştirilmek istendiğinde bazik tamponlar kullanılmalıdır. Analit dalgalarının örtüşmesi halinde bunların birbirinden ayrılabilmesi için analitin akım-potansiyel ilişkilerinin pH'a bağlılığı göz önüne alınarak destek elektrolitin pH'ı ayarlanmalıdır (Tural ve ark., 2006).

#### **1.4.3. Sıcaklık Kontrolü**

Tüm voltammetrik sınır akım eşitliklerinde diffüzyon katsayısı (D) yer aldığı anda sıcaklık, akım şiddetini değiştirir. Sıcaklıktaki 1 °C'lik değişim elektroetkinlerin çoğunun diffüzyon katsayısının %1-2 oranında değiştirir. Bu nedenle çalışmalar termomatik koşullarla yapılmalı ve sıcaklık  $\pm 0,5$  °C aralığında sabit tutulmalıdır (Tural ve ark., 2006).

#### **1.4.4. Oksijen Uzaklaştırılması**

Çalışma çözeltilerinde çözülmüş oksijen gazı, çalışma elektrotlarında iki basamakta indirgenir. Bu basamaklar,



tepkimeleriyle gösterilebilir.

Çözülmüş oksijenin çözeltiden N<sub>2</sub>, He, CO<sub>2</sub> gibi elektroinert bir gaz geçirilerek uzaklaştırılması gerekir. İnert gaz geçirme süresi; 2-30 dakika kadardır. Pratikte, oksijene ait bu dalgalar tamamen kaybolana dek gaz geçirme işlemi sürdürülür. Ayrıca çalışma süresince sisteme atmosferik oksijenin difüzyonunu önlemek amacıyla çözelti inert gaz atmosferinde tutulur. Bazik çözeltilerle çalışıldığında, oksijen sodyum sülfid ile giderilebilir (Tural ve ark., 2006).

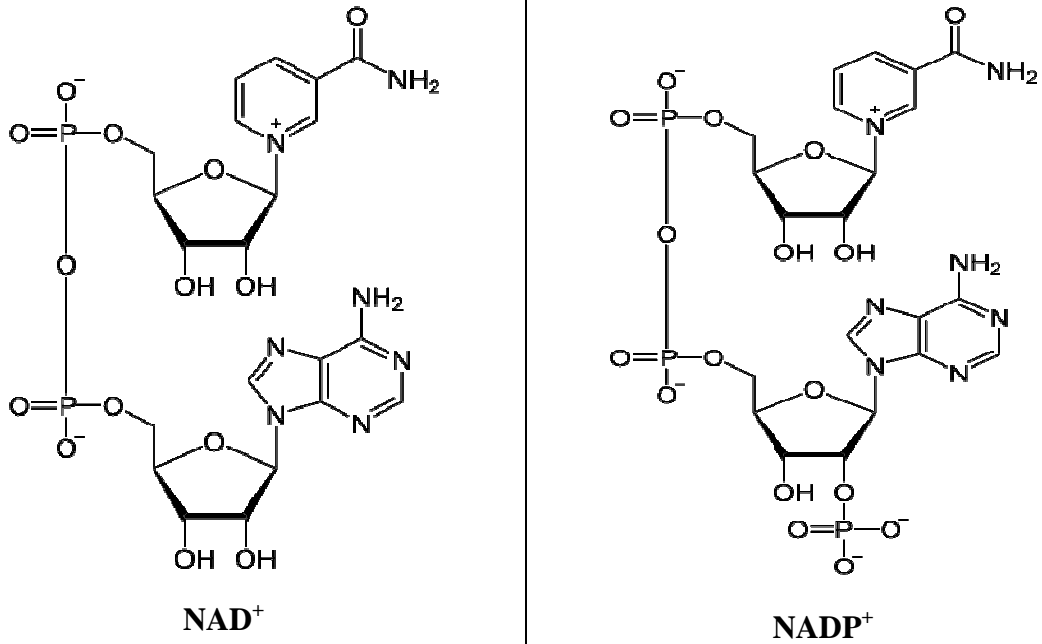
#### **1.5. NADH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit)**

Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD<sup>+</sup>) hücrelerde bulunan önemli bir koenzimdir. Elektron taşıyarak indirgenme potansiyelinin moleküller arasında aktarılmasında rol oynar. NADH, NAD<sup>+</sup> 'nin indirgenmiş halidir, dolayısıyla NAD<sup>+</sup> de NADH'nin yükseltgenmiş (okside olmuş) halidir.

##### **1.5.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri**

NADH'nin molekül formülü C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub> olup, molekül ağırlığı 663,43 g/mol iken sodyum tuzunun molekül ağırlığı 709,41 g/mol dür. NAD<sup>+</sup> molekülünün bir ucunda adenin buna bağlı bir riboz şekeri, riboz şekerine bağlı iki fosfat grubu, bunlara bağlı bir riboz şekeri daha ve bu riboz şekerine bağlı bir nikotinamid halkası bulunmaktadır

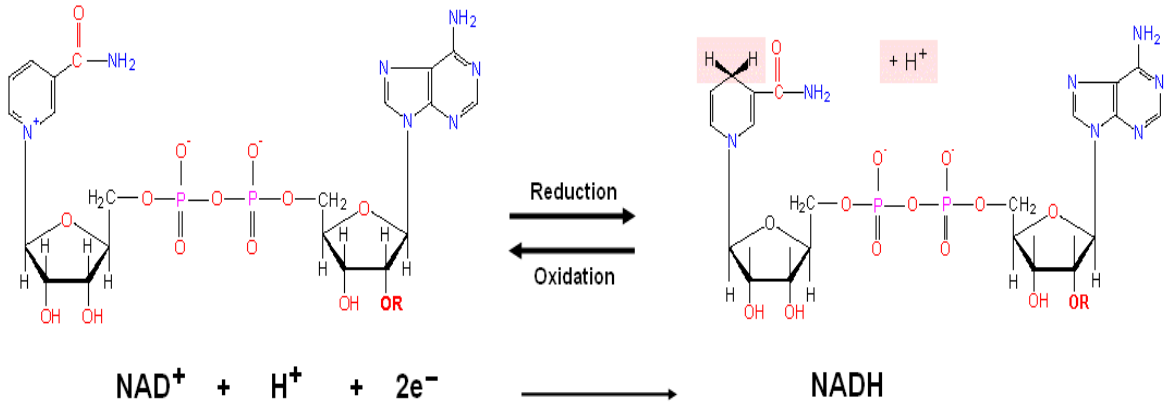
(Gözükara, 2001). (Şekil6). Yapıdaki riboz halkarından birinin ilk karbon atomuna (1' pozisyonu) adenin nükleotidi bağliırken, diğeriindeki karbon atomuna nikotinamit nükleotidi bağlanmıştır. NADP<sup>+</sup>'nin NAD<sup>+</sup>'den farkı adenine bağli riboz şekerinin ikinci karbonundaki hidroksil grubuna bir fosfat grubunun bağlanmasıdır. Bu iki koenzime piridin koenzimler yada piridin nükleotidler adı verilmektedir. Bu koenzimin tüm formları beyaz amorf toz halinde olup, hidroskopik özelliğe ve suda yüksek çözünürlüğe sahiptir (50 mg/mL). Katı olarak kuru ve karanlıkta saklandığı sürece kararlıdır (Wikipedia, 2010).



Şekil 6. NAD<sup>+</sup> ve NADP<sup>+</sup> nın yapısı.

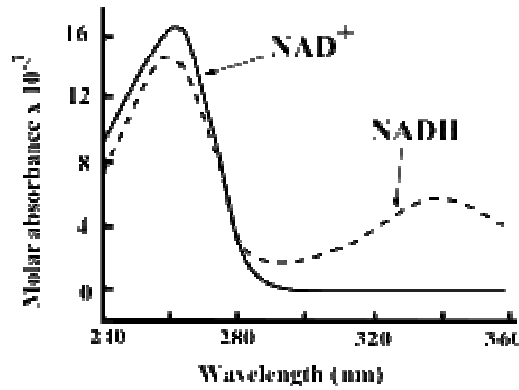
NAD<sup>+</sup> 2 elektron ve 1 H<sup>+</sup> alarak indirgenerek NADH oluşturur. Bu redoks tepkimesinde bir elektron NAD<sup>+</sup>'nin nikotinamit halkasının pozitif yüklü azotuna transfer olurken, bir elektron ve hidrojen atomu bu azotun karşısındaki C<sub>4</sub> karbon atomuna transfer olmaktadır.

NAD<sup>+</sup>/NADH redoks çiftinin yarı dalga potansiyeli -0.32 V olup, bu potansiyel NADH'nin çok güçlü bir reaktif olduğunu göstermektedir.



Şekil 7.  $\text{NAD}^+$ 'nın redoks tepkimesi.

Hem  $\text{NAD}^+$  hem de  $\text{NADH}$  yapısındaki adenin bazından dolayı morötesi bölgedeki ışınları kuvvetli bir şekilde absorblarlar.  $\text{NAD}^+$  ve  $\text{NADH}$  maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 259 nm olup molar soğurma katsayısı 16900 L/mol.cm iken  $\text{NADH}$  ayrıca 339 nm'de molar soğurma katsayısı 6222 L/mol.cm olan ikinci bir absorpsiyon piki vermektedir (Şekil 8). Yüksek dalga boyundaki koenzimin indirgenmiş ve yükseltgenmiş formların UV absorpsiyon spektrumları arasındaki fark, enzim analizlerinin kolay ve basit bir şekilde gerçekleşmesine olanak sağlar. Bu tür analizler, bir spektrofotometre yardımıyla 340 nm de birinin diğerine dönüşümü ölçülerek gerçekleştirilir.



Şekil 8.  $\text{NAD}^+$  ve  $\text{NADH}$ 'nin UV absorpsiyon spektrumu.

Ayrıca  $\text{NAD}^+$  ve  $\text{NADH}$  floresans özelliklerinde de farklılık gösterirler.  $\text{NADH}$  çözeltileri 460 nm dalga boyunda bir emisyon pikine sahip olup floresans ömrü 0,4 nanosaniye iken,  $\text{NAD}^+$  floresans özellik göstermemektedir.  $\text{NADH}$  proteinlere bağlandığında floresans sinyalinde değişme gözlenir, bu özellik enzim kinetiği

çalışmalarında oldukça yararlı olan ayrışma sabitlerinin ölçülmesinde kullanılabilir. Ayrıca floresanstaki bu değişimler floresans mikroskobu ile ölçülerek, canlı hücrelerindeki redoks basamağının belirlenmesinde de kullanılabilir.

### **1.5.2. Canlı Sistemlerdeki Rolü**

Enzimler çok güçlü katalizörler olup, bunların çoğu canlı hücrede her iki saniyede bir 10.000 den fazla tepkimenin gerçekleşmesinde kullanılmaktadır. Bunlar arasında, yükseltgenme indirgenme tepkimelerini katalizleyen redoks enzimleri, basit elektron transfer tepkimelerinin, atom transferinin veya küçük gruplu atomların, substrata taşınmasının katalizlenmesinde bulunurlar. Bazı redoks enzimleri aktivite gösterebilmek için koenzim olarak adlandırılan küçük bir moleküle ihtiyaç duyar. Koenzimler küçük gruplar, atomlar veya elektronlara karşı bir alıcı veya verici olarak görev yapar ve substratın yükseltgenmesi veya indirgenmesinde yürütücü bir güç sağlar (Simon ve Bartlett, 2003).

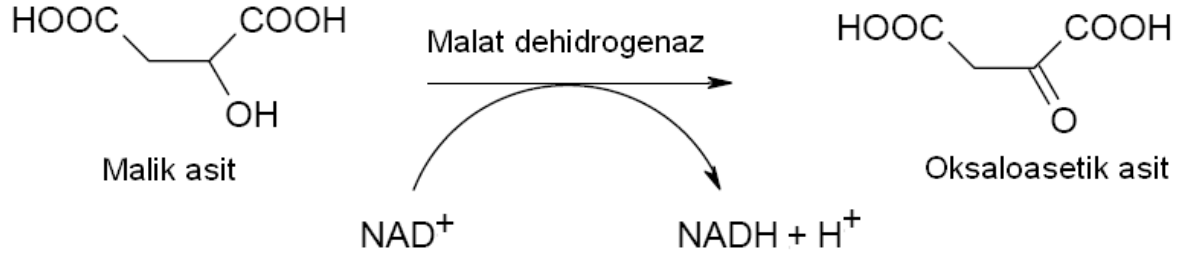
Piridin nükleotitleri olarak bilinen nikotin amid adenin dinükleotid (NAD<sup>+</sup>) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) tüm canlı hücrelerde bulunan ve 400'ten fazla oksidoreduktazın (yükseltgenme indirgenme tepkimelerini katalizleyen enzimler) tepkimelerinin gerçekleşmesi için gerekli olan koenzimlerdir (Gorton ve Dominguez, 2002). Bu sayı sınıflandırılan tüm enzimlerin % 17'si ifade eder ve bu nükleotidler diğer tüm koenzimlerden daha çok enzimatik reaksiyonlardan sorumludurlar.

Metabolizmada NAD<sup>+</sup>, redoks tepkimelerine katılarak elektronları bir tepkimeden diğerine taşımakta görev alır ve yakıt moleküllerinin yükseltgenmesinde en büyük elektron taşıyıcısıdır. Bu yüzden bu koenzim hücrede iki formda bulunur ki birincisi yükseltgenme reaktifi NAD<sup>+</sup> olup diğer moleküllerden elektron alır ve indirgenmiş formuna dönüşür. İkincisi ise bu tepkime sonucu oluşan NADH, indirgenme reaktifi olup elektron vericisi olarak kullanılır. Bu elektron transfer tepkimeleri NAD<sup>+</sup>/NADH'nin ana özelliklerindedir (Wikipedia, 2010). Özellikle substrattan bir elektron alıcısına hidrojen atomlarının ve elektronların transferinin gerçekleştiği dehidrogenaz enzimlerinin tepkimelerinde (Tepkime 1.5), NAD<sup>+</sup> elektron alıcısı olarak görev alır.



SH<sub>2</sub> ve S sırasıyla substratın indirgenmiş ve yükseltgenmiş formudur. Bu tür enzimatik reaksiyonlarda, NAD(P)<sup>+</sup>'nin nikotinamid halkası, bir hidrür iyonuna eşdeğer olan 2 elektron 1 proton alarak NAD(P)H ye indirgenir.

NAD<sup>+</sup>'nın koenzim olarak girdiği reaksiyonlardan birisi, malat dehidrogenaz enziminin yardımıyla malik asit oksaloasetik asite dönüşmektedir. Reaksiyon şekil 9'daki gibi meydana gelmektedir (Gözükara, 2001).



Şekil 9. Malik asitin enzimatik tepkimesi.

Tepkimede görüldüğü gibi malik asitin 2. nolu karbonundan 2 elektron ve bir hidrojen atomu NAD<sup>+</sup> molekülüne transfer edilmiş ve bir hidrojen ise ortamda serbest kalmıştır.

Organizmada, NAD<sup>+</sup> amino asitler triptofan yada aspartik asitten sentezlenebilir. Alternatif olarak, koenzimlerin daha karmaşık karışımları gıdalardan niyasin olarak isimlendirilen vitamin B<sub>3</sub>'den alınabilir. Bazı NAD<sup>+</sup> molekülleri NADP<sup>+</sup>'ye dönüşebilir, bu iki enzimin kimyasal yapısı ve özellikleri birbirine çok yakın olmasına karşın (Şekil 6), metabolizmadaki rolleri farklıdır (Wikipedia, 2010). NADPH, enerjice zengin biyolojik molekülleri sentezlemek için gerekli elektronları sağlayarak anabolik tepkimeleri katalizleyen enzimlerle çalışır. Buna karşın, NADH hücredeki mitokondride yiyecek maddelerinin yükseltgenmesiyle gerçekleşen Adenozin trifosfat (ATP)'nin oluşum sisteminde bir ara ürün olarak önemli bir rol oynar. Mitokondride yiyeceklerin yükseltgenmesiyle salınan enerjinin % 42 si ATP molekülünde saklanmaktadır. NADH mitokondride büyük bir miktarda bulunarak Adenozin difosfatın (ADP)'nin ATP'ye dönüşümünde önemli rol oynar. Oksijenle bir molekül NADH'nin yükseltgenmesi ADP'den birkaç molekül ATP ve inorganik fosfat sentezlemek için yeterli enerji sağlar (Simon ve Bartlett, 2003).

Bu önemli fonksiyonları yanında, NADH organizmada aşağıda özetlenen fonksiyonlara da sahiptir.



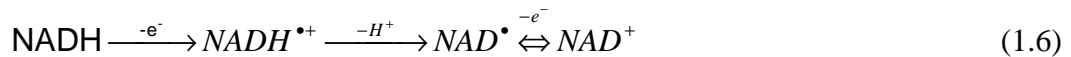
- 1- NADH zarar görmüş hücre ve DNA'ları onarır.
- 2- NADH oldukça güçlü bir antioksidandır.
- 3- NADH adrenalin ve dopamini uyarma özelliğine sahiptir.
- 4-NADH nörotaşıyıcı(neurotransmitter) özellik gösteren ve kan damarlarının gevşemesinde en önemli etki gösteren, nitroksit üretimini arttırmaktadır.

### **1.5.3. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesi**

#### **1.5.3.1. NADH'nin Direk Elektrokimyasal Yükseltgenmesi**

NADH'nin biyolojik rolü ve öneminden dolayı, elektrokimyasal yükseltgenmesine yönelik çalışmalar büyük bir ilgi görmüştür. NADH'nin elektrokimyasal yükseltgenmesi üzerine yapılan çalışmalar döngüsel voltammetri, kronoamperometri, sabit potansiyelde kulometri ve döner disk elektrot metodolojisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Camımsı karbon, karbon pasta, pirolitik grafit ve karbon fiber gibi karbon bazlı elektrotlar, Pt, Au gibi katı elektrotlar bu amaçla kullanılan elektrotlardır. NADH'nin bu elektrotlarda (modifiye edilmemiş) direk olarak yükseltgenmesi oldukça tersinmez olup, çok büyük aşırı potansiyel gerektirmektedir. Elektrot materyali, aşırı potansiyel üzerine önemli bir etkiye sahiptir. Sulu çözelti ortamında NADH'nin yükseltgenmesi, karbon, Pt ve Au elektrotlarda sırasıyla yaklaşık 0,4; 0,7 ve 1,0 V bulunmuştur (Gorton ve Dominguez, 2002).

Normal yalın elektrotta NADH'nin yükseltgenmesi bir ECE (Elektrokimyasal-Kimyasal-Elektrokimyasal) mekanizması önerilerek açıklanmıştır. Bu mekanizmaya göre; ilk olarak NADH'nin bir elektrot tepkimesiyle bir  $e^-$  vererek  $NADH^{\bullet+}$  radikaline yükseltgendiği; ikinci olarak oluşan bu radikalinde bir kimyasal tepkimeyle  $1 H^+$  vererek  $NAD^{\bullet}$ ye dönüştüğü; son olarak da yine bir elektrot tepkimesiyle  $NAD^{\bullet}$   $1 e^-$  vererek  $NAD^+$  ya yükseltgendiği rapor edilmiştir. (Tepkime 1.6). NADH'nin sulu ortamdaki döngüsel voltammogramlarında NADH'nin yükseltgenmesine ilişkin sadece tek bir pik gözlenmesi yani geri dönüşümde herhangi bir pikin gözlenmemesi oluşan  $NAD^{\bullet+}$ 'nin aratüre ( $NAD^{\bullet}$ ) indirgenmesinden kaynaklanmaktadır. Sonuçta kimyasal olarak oldukça tersinmez  $2e^-$  ve  $1 H^+$  'lu yükseltgenme tepkimesi gerçekleşmiştir (Tepkime 1.7). (Gorton ve Dominguez, 2002).

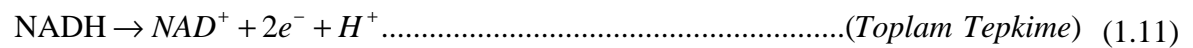
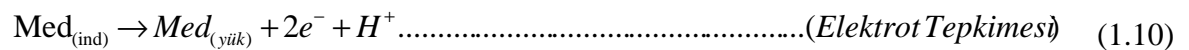
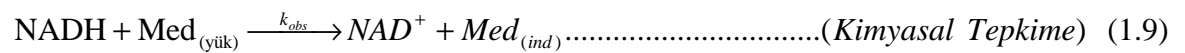
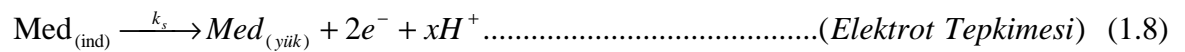


Elektrot olayı sırasında gerek oluşan yükseltgenme ürünü  $NAD^+$  ve gerekse bu yükseltgenme prosesi esnasında oluşan radikaller ( $NADH^+$  ve  $NAD^{\cdot}$ ) elektrot yüzeyine adsorplanarak, elektrodun kirlenmesine ve dolaylı olarak da  $NADH$ 'nin direk elektrokimyasal yükseltgenmesine bağlı sensörlerin tekrarlanabilirliğinin azalmasına neden olmaktadır (Gorton ve Dominguez, 2002; Simon ve Bartlet, 2003). Bu problemlerin çoğu, redoks mediyatörlerinin elektrot yüzeyine tutturulmasıyla hazırlanan kimyasal modifiye elektrotların kullanımıyla çözülmüştür (Gorton ve Dominguez, 2002; Simon ve Bartlet, 2003).

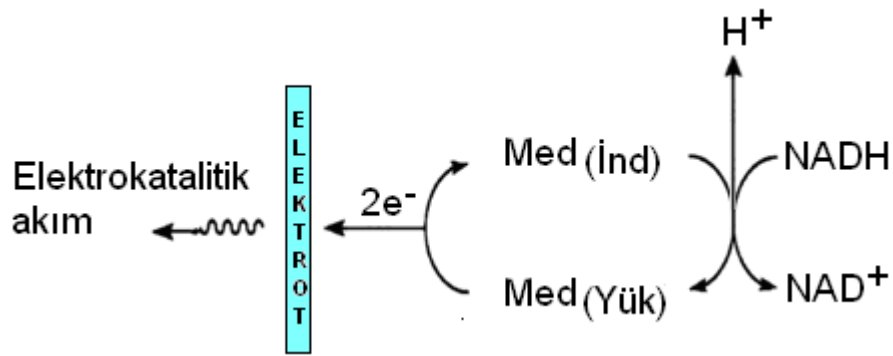
### **1.5.3.2. $NADH$ 'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesinde Redoks Mediyatörlerin Rolü**

Mediyatörler substrat ile elektrot arasındaki elektronları götürüp getiren küçük moleküller olup, elektrot rekasiyonlarını katalizlerler. Bir mediyatörün  $NADH$ 'ye iyi bir elektrokatalitik etki gösterebilmesi için, i) mediyatör elektrokimyasal olarak aktif olmalı ii) redoks mediyatörün formal potansiyeli ( $E^0$ )  $NADH$ 'nin yükseltgenme potansiyelinden daha düşük olmalı iii) yüksek elektron transfer hız sabitine sahip olmalı iv) enzimatik olarak aktif  $NAD^+$ 'yi oluşturmalı v) elektrot yüzeyini kirlenmeye özelliğine sahip olmalı vi) uzun süre kararlı olmalı vii)  $NADH$ 'ye ait aşırı potansiyeli oldukça düşürmelidir.

$NADH$ 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinin ilk basamağında mediyatörün yükseltgenmiş formu,  $NAD(P)H$  ile hızlıca bir kimyasal tepkimeye girip  $NAD(P)^+$  yi oluştururken kendisi indirgenmiş formuna dönüşür, ikinci basamakta ise elektrot tepkimesi aracılığıyla mediyatörün indirgenmiş formu  $NADH$ 'nin direk yükseltgendiği potansiyelden daha düşük bir potansiyelde tekrar yükseltgenir (Şekil 10). Oluşan  $NADH$  tekrar mediyatörle tepkimeye girerek benzer olaylar devam eder. Gerçekleşen elektrokatalitik yükseltgenme ECE mekanizmasıyla açıklanmış ve aşağıdaki tepkimelerle de ifade edilmiştir. Sonuçta mediyatörün indirgenmiş formunun tekrar yükseltgenmesiyle  $NADH$ 'ye ilişkin elektrokatalitik akım oluşmaktadır (Gorton ve Dominguez, 2002; Simon ve Bartlet, 2003).



Bu ECE mekanizmasına göre elektrot yüzeyinde başlangıçta indirgenmiş formda olan mediyatör ( $Med_{ind}$ ), pozitif potansiyel uygulandığında, formal potansiyelinin ötesinde pozitif potansiyelde katalitik olarak aktif olan yükseltgenmiş formuna ( $Med_{yük}$ ) dönüşür.  $k_s$  immobilize edilmiş mediyatör ile elektrot arasındaki elektron transfer hızıdır. Bu reaksiyondaki proton mediyatörün yapısına ve ortamın pH'ına göre 1 ile 2 arasında değişebilir. Daha sonra çözeltideki NADH'nin elektrot yüzeyine taşınmasıyla kataliz başlar, bu esnada tepkime 1,9'daki kimyasal tepkime gerçekleşir. Bu tepkimedeki  $k_{obs}$  ikinci mertebeden hız sabitidir .

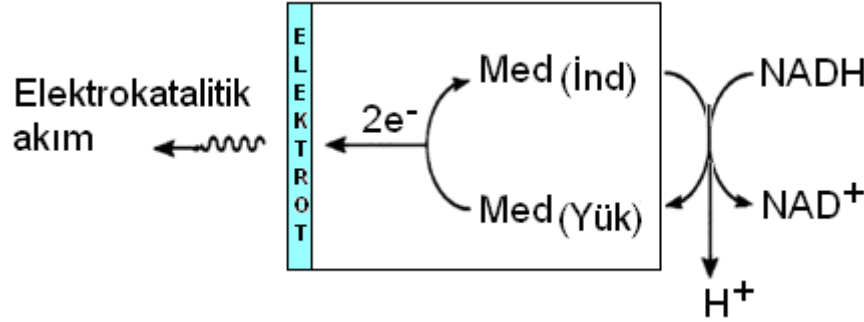


Şekil 10. Bir redoks mediyatörle NADH'nin yükseltgenme mekanizması.

Çözelti ortamında kullanılan çözülebilir redoks mediyatörlerinin en büyük dezavantajı elektrot yüzeyinden diffüzenerek uzaklaşabilmesidir. Böylece mediyatör elektrot yüzeyine uzun süre bulunamadığından elektrot tepkimesi katalizlenmeyebilir. Bu problemi gidermek için, bu redoks mediyatörlerle modifiye elektrot hazırlama yoluna gidilmiştir. Daha önceki bölümlerde daha detaylı bahsedilen modifiye elektrotlar farklı yollarla hazırlanmıştır. Bunlardan en önemlileri, i) redoks mediyatörlerin seyreltik çözeltilerine daldırarak doğrudan adsorbisyonla ii) bu boyar maddelerin elektrot yüzeyine kovalent bağlanması ile iii) elektrot yüzeyinin polimer ya da metalik ince film ile kaplanması ile (elektropolimerizasyon) iv) boyar maddeler ince tabakalı materyallere (zirkonyum fosfat, titanyum fosfat, zeolit, muskovit vb.) adsorplandıktan sonra, elektrot materyali (genellikle grafit ya da camımsı karbon tozu) ile karıştırılarak kompozit oluşturma ile modifiye elektrot hazırlamaktır. .

Böylece, elektrot yüzeyine adsorplanmış ya da tutturulmuş redoks mediyatörleri NADH'nin yükseltgenme potansiyelini daha negatife çekerek hem girişimcilerin etkisini giderir hem de akım artışına neden olan elektrokatalitik etki göstermektedirler. Elektrot

yüzeyinde tutturulmuş mediyatör aracılığıyla NADH'den elektrot yüzeyine elektron transferi gerçekleşir. (Simon ve Bartlett, 2003). (Şekil 11).



Şekil 11. Redoks mediyatörle modifiye edilmiş elektrotlarda NADH'nin yükseltgenme mekanizması.

#### 1.5.4. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesinde Kullanılan CME'ler

CME hazırlanarak NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine yönelik ilk makale 1978 yılında Tse ve Kuwana tarafından yayınlanmıştır (Tse ve Kuwana, 1978). Bu çalışmada, primer amin grubu içeren 2 orto-kinon türevi, dopamin ve 3-4-dihidroksi benzilamin, siyanürik klorürle aktive edilmiş camımsı karbon elektrot (glassy carbon electrode, GCE) yüzeyine kovalent bağlanma yoluyla tutturulmuştur. Bu modifiye elektrodun pH 7,0'de alınan döngüsel voltammogramlarından formal potansiyel doymuş kalomel elektroda (DKE) karşı 0,16 V, NADH varlığında ise anodik pik potansiyeli yaklaşık +0,2 V olarak bulunmuştur. Böylece aşırı potansiyel, yalın GCE'ye göre yaklaşık 0,4 V indirgenmiştir. Bu ilk çalışmadan sonra NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanılmak üzere değişik türlerde mediyatörlerle kimyasal modifiye elektrotlar hazırlanmıştır.

Özellikle azin türü boyar maddeler NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde redoks mediyatörü olarak oldukça çok kullanılmışlardır. Bunun nedeni birçok bileşiğin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etki gösterme özelliğine sahip olmalarındandır. Bu amaçla toluidin mavisi (TM), metilen mavisi (MM), metilen yeşili (MY), azure A (AzA), azure B (AzB) gibi fenotiyazin grubu boyar maddeler, nil mavisi (NM), meldola mavisi (MDM), brilliant kresil mavisi (BKM) gibi fenoksazin ve nötral kırmızısı (NK) gibi fenazin türü boyar maddelerle modifiye elektrotlar hazırlanmıştır.

#### 1.6. Fotoelektrokimya ve NADH'nin Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi

Bir fotoakım spektroskopisi olarak da bilinen fotoelektrokimya, bir elektrolitteki metal veya bir elektrodun ışıklandırılmasıyla oluşan elektriksel akımın değerlendirilip

ölçüldüğü bilim dalıdır. Işıkla sadece elektrot etkileşime girmez, aynı zamanda elektrodun yakınındaki elektrolitte fotolitik olarak etkileşime girer. Bu olayda, elektrot ve elektrolit tarafından adsorplanan ışık fotoakımı oluşturmaktadır. Bu fotoakım ışığın dalga boyu, elektrot potansiyeli ve elektrolitin bileşimiyle değişmektedir. Bu değişim foto prosesin doğasını, kinetik ve enerji düzeyleri hakkında bilgi verir (Dilgin, 2004). Fotoelektrokimyanın analize uygulanmasında, yarıiletken, modifiye ve kompozit elektrotlar oldukça sık kullanılmaktadır.

Wang ve arkadaşları fotoelektrokimyasal sensördeki gelişmeler üzerine bir derleme yayınlarak, fotoelektrokimyasal analizlerin dikkate değer duyarlılık, doğasındaki minyatürizasyon yeteneği, kolay taşınabilirlik ve entegrasyon gibi özelliklerinden dolayı gelecek için umut verici bir analitik yöntem olduğunu vurgulamışlardır (<sup>a</sup>Wang ve ark., 2009). Bununla birlikte NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi Xu ve arkadaşları tarafından da gerçekleştirilmiş ve DA modifiye nanoporöz TiO<sub>2</sub> film elektrot ile duyar NADH tayini için yeni bir fotoelektrokimyasal metodoloji bulmuşlardır (<sup>b</sup>Wang ve ark., 2009).

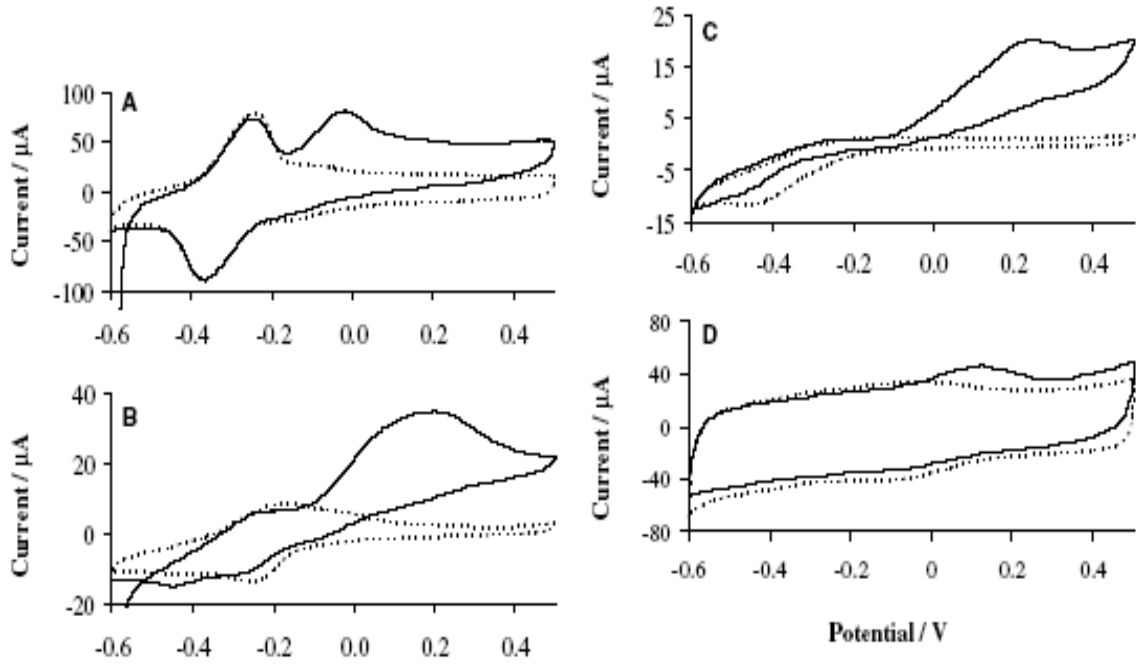
## BÖLÜM 2

## ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

## 2.1.Fenotiyazinlerle Hazırlanmış Modifiye Elektrotlar ve Analitik Uygulamaları

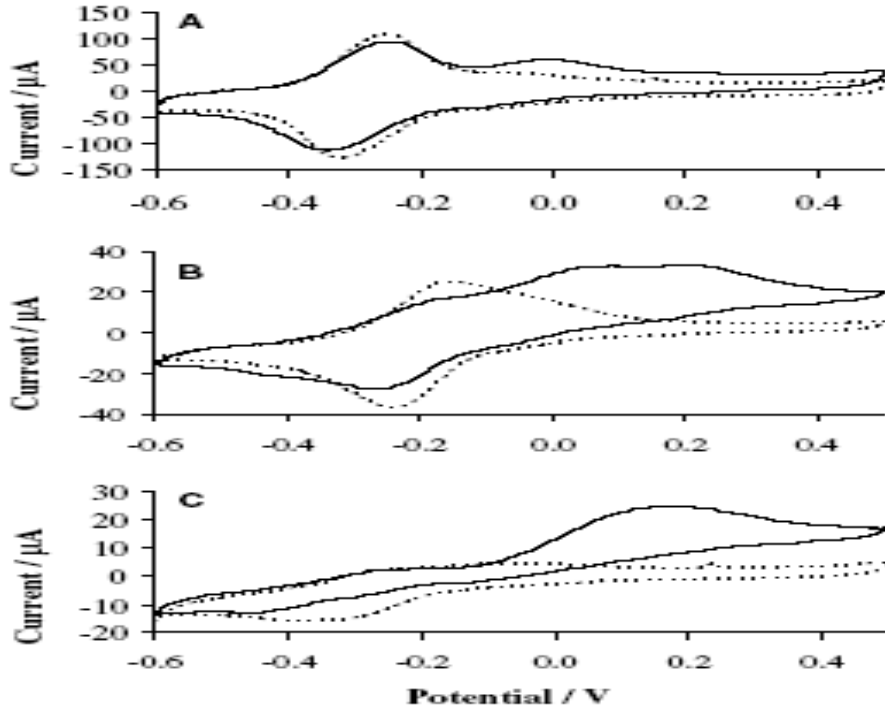
## 2.1.1. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesine Dayalı Yapılan Çalışmalar

Bu çalışmaların birinde; Lawrence ve Wang sırasıyla pirolitik grafit elektrot (PGE) yüzeyine, Karbon Nanotüp tutturulmuş PGE'ye ve grafit tozu tutturulmuş PGE yüzeyine fenotiyazin türü boyar maddeler olan TM ve AzC adsorblayarak modifiye elektrotlar hazırlamışlar ve NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi çalışmalarında kullanmışlardır (Lawrence ve Wang, 2006). TM modifiye elektrotların ve sadece CNT tutturulmuş modifiye elektrodun NADH varlığı ve yokluğundaki döngüsel voltamogramları Şekil-12'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi NADH'ye en iyi yanıtın TM-CNT/PGE'nin verdiği gözlenmiştir (Lawrence ve Wang, 2006).



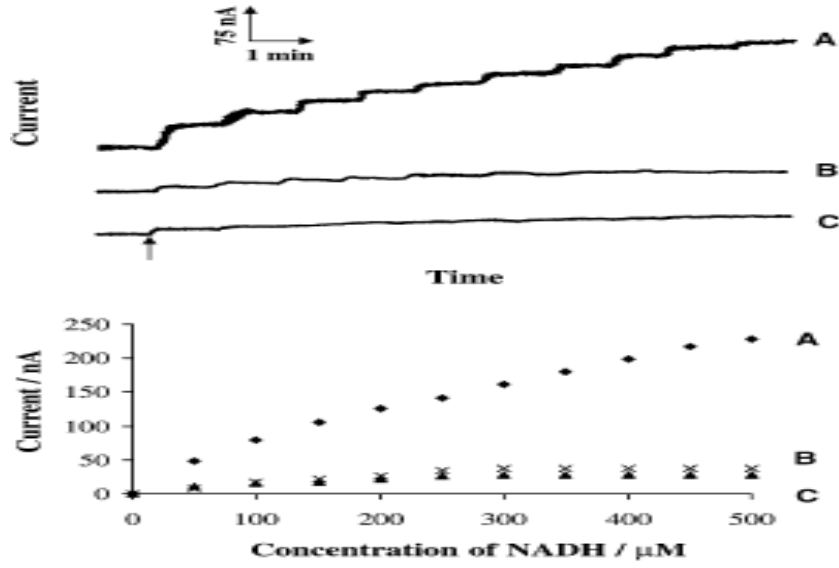
Şekil 12. pH 7,4 fosfat tamponunda, 50mV/s tarama hızında A:TM-CNT, B:TM-PGE, C:TM-GT, D:Yalın CNT modifiye elektrotlarının 5mM NADH yokluğunda ve varlığındaki döngüsel voltametrik yanıtları.

AzC modifiye elektrotların NADH varlığı ve yokluğundaki döngüsel voltammogramı ise Şekil 13'te verilmiştir. AzC-CNT/PGE'nin NADH'ye yanıtının diğer elektrotlardan daha iyi olduğu şekilden görülmektedir (Lawrence ve Wang, 2006).



Şekil 13. Şekil 12’deki aynı deney şartları altında 5mM NADH yokluğunda ve varlığındaki A:AC-CNT, B: AC-PGE, C:AC-GT, D: Yalın CNT modifiye elektrotlarının döğüsel voltammetrik yanıtları.

Şekil 14’te TM-CNT/PGE, TM-GT/PGE ve CNT/PGE’nin NADH’ye amperometrik yanıtı verilmiştir. Akım zaman eğrileri -0,2 V uygulama potansiyelinde, 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu ortamında ve 300 rpm’lik karıştırma hızında her 50 mM NADH ilavesi sonucu elde edilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi en duyar yanıtın TM-CNT/PGE olduğu bulunmuştur (Lawrence ve Wang, 2006).

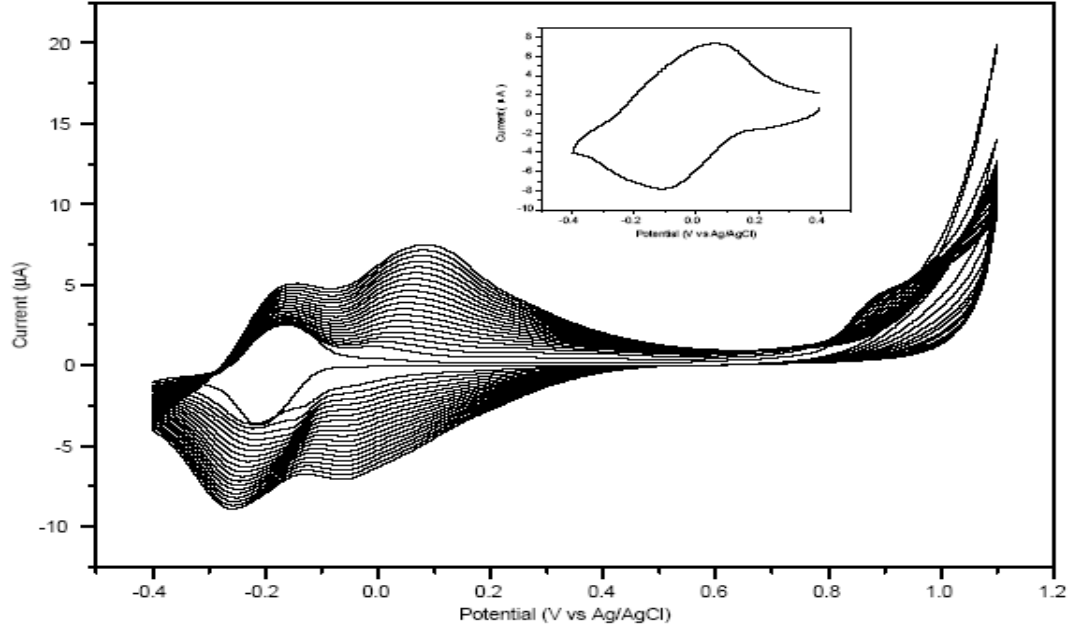


Şekil 14. A:TM-CNT/PGE, B:TM-GT/PGE ve C: CNT/PGE çalışma elektrotlarına ardışık 50µM NADH ilavesinde oluşan akım-zaman eğrileri.

Sonuçlardan NADH tayini için kolay ve ucuz geliştirilen sensörün TM-CNT/PGE olduğu bulunmuştur. (Lawrence ve Wang, 2006).

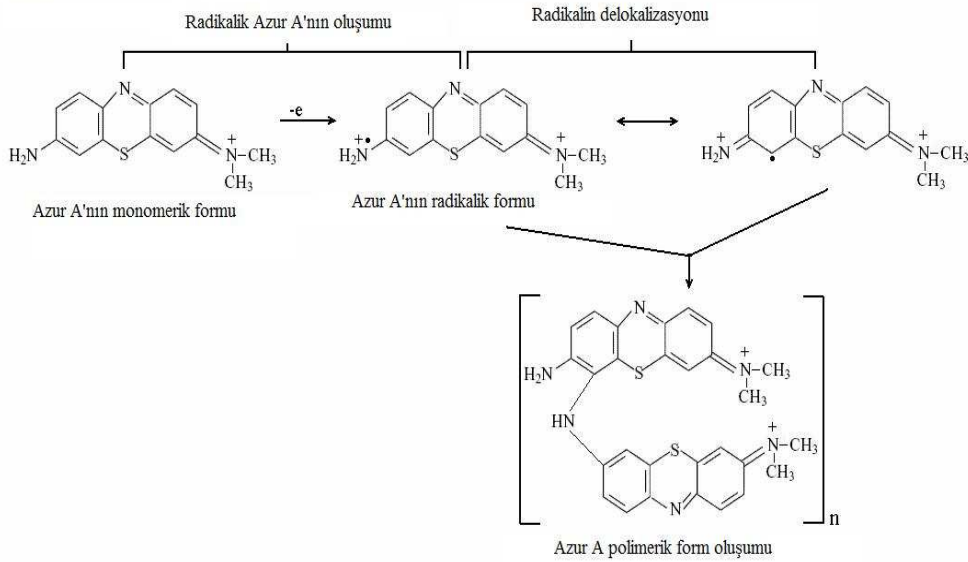
Bu alanda yapılan çalışmalardan bir diğerinde ise Gao ve arkadaşları, TM ve AzA boyar maddelerini screen-printed karbon elektrot yüzeyine elektropolimerizasyon yoluyla modifiye etmiş ve elde edilen modifiye elektrotlarla akışa enjeksiyon sisteminde NADH tayinini gerçekleştirmişlerdir (Gao ve ark., 2004). 0,2 mM AzA'nın pH 6,9 fosfat ortamındaki elektropolimerizasyonu şekil 15'de görülmektedir. Şekilden görüldüğü gibi ilk döngüde monomerik AzA'ya ilişkin piklerin gözlemlendiği, döngü sayısının artmasıyla da polimerik türe ait yeni piklerin oluştuğu gözlenmiştir. Yaklaşık 850 mV da gözlenen pikin AzA'daki  $-NH_2$  gruplarının yükseltgenerek radikalik forma dönüştüğünü göstermektedir. Oluşan radikalik form AzA'daki aromatik halkaya delokalize olur ve bu iki radikal yoluyla C-N birleşmesi ve dolayısıyla dimerleşme ve döngü sayısının artmasıyla da polimerleşme gözlenir. Gerçekleşen mekanizma şekil 16'da verilmiştir (Gao ve ark., 2004).





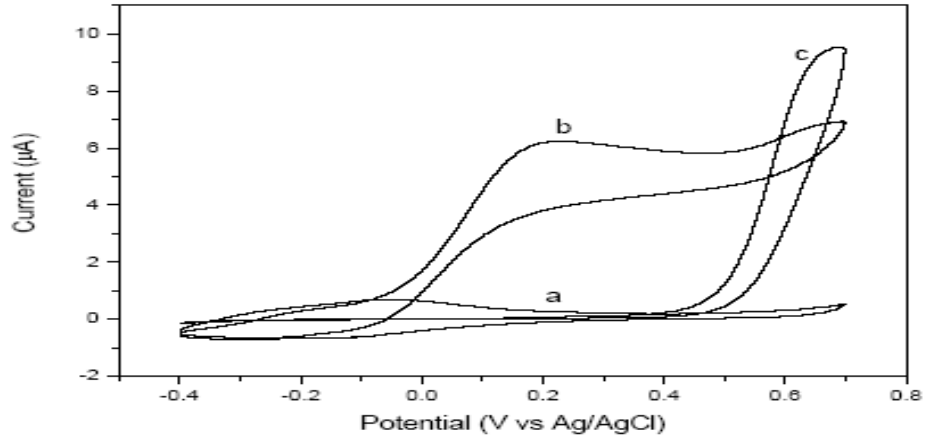
Şekil 15. 50 mV/s tarama hızında 0,2mM AzA içeren pH:6,9 fosfat tamponunda AzA'nın elektropolimerizasyon prosesi boyunca döngüsel voltamogramları (başlangıç potansiyeli 0,4V Ag/AgCl) Ekte 50mV/s tarama hızında 0,2M pH 6,9 fosfat tamponunda poli(AzA) modifiye elektrodunun döngüsel voltammogramlarını gösterir.

#### Polimerizasyon mekanizması



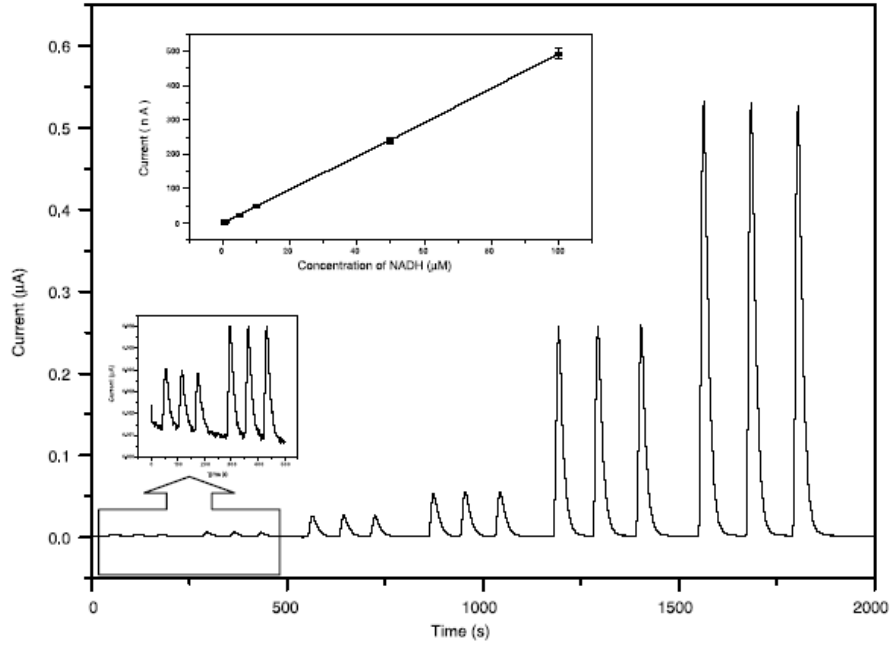
Şekil 16. AzA'nın elektropolimerizasyon mekanizması.

Şekil 17 ise elde edilen poli-AzA modifiye screen-printed karbon elektrotun NADH varlığında ve yokluğundaki döngüsel voltammogramını göstermektedir. Şekilden görüldüğü üzere normal yalın screen-printed elektrotta NADH yaklaşık 600 mV'da yükseltgenirken, poli-AzA modifiye elektrotta modifiye elektrodun polimerik pik potansiyeline yakın bir potansiyelde (yaklaşık 100 mV da ) yükseltgenmiştir. Böylece AzA modifiye elektrot NADH'nin aşırı potansiyelini yaklaşık 500 mV daha negatife kaydırarak elektrokatalitik etki göstermiştir (Gao ve ark., 2004).



Şekil 17. 5 mV/s atarım hızında, 0,1 mM NADH varlığında (b ve c) ve yokluğundaki poli-AzA modifiye screen-printed karbon elektrodun (a ve b) ve yalın screen printed karbon elektrodun c döngüsel voltammogramları.

Şekil 18'de akışa enjeksiyon sisteminde poli-AzA modifiye elektrodun NADH'ye olan yanıtı görülmektedir. Akışa enjeksiyon sistemindeki akım zaman eğrileri 200 mV uygulama potansiyelinde, 0,75 mL/dk akış hızında ve pH 6.9 fosfat tamponu ortamında  $5 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-4}$  M aralığında değişen NADH çözeltileri için kaydedilmiştir. Belirtme alt sınırı  $2 \times 10^{-7}$  M olarak bulunmuştur. Aynı işlemler TM modifiye elektrot için tekrarlanmış ve belirtme alt sınırı  $3,2 \times 10^{-7}$  M bulunmuştur (Gao ve ark., 2004).



Şekil 18. Poli-AzA modifiye screen-printed karbon elektrotta NADH enjeksiyonu ile akışa enjeksiyon yanıtları. NADH çözeltisinin derişimi  $5 \times 10^{-7}$ 'den  $1 \times 10^{-4}$  M'a artmıştır. Akış hızı:75mL/dk, uygulama potansiyeli 0,2 V'dur. Elektrolit ve taşıyıcı pH 6,9 fosfat tamponudur.

Sonuç olarak fenotiyazin türü modifiye screen-printed elektrotların NADH'nin yükseltgenmesinde iyi bir elektrokatalitik etki ve iyi bir kararlılık gösterdiği tespit edilmiştir (Gao ve ark., 2004).

Bazı Fenotiyazin türü boyar maddelerle hazırlanmış modifiye elektrotlar ve NADH' ye yanıtı Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine dayalı yapılan bazı çalışmalarda kullanılan fenotiyazin grubu redoks medyatörleri

Mediyatör	Modifiye Elektrot Şekli	Kullanılan Yöntem	Açıklama	Kaynak
<b>Metilen Mavisi</b>	GCE yüzeyinde MM ile pirolün koelektropolimerizasyonu	CV, FIA	A:0,1 - 2000 $\mu$ M, B:0,025 $\mu$ M (NADPH) A:0,1 - 1300 $\mu$ M, B:0,04 $\mu$ M (NADH) C: 400 mV(Ag/AgCl)	Chi ve Dong, 1994.
	Pt elektrot üzerine tutturulmuş selüloz asetat/ZrP ile iyon değişimi	CV, AMP	A:0,3 mM'a kadar doğrusal	Borgo ve ark., 2002.
	MM adsorplanmış ZrP ile modifiye CPE	CV	A: $1 \times 10^{-4}$ - $2 \times 10^{-3}$ M, B:10 $\mu$ M	Pessoa ve ark., 1997.
	MM adsorplanmış SiO <sub>2</sub> /ZrO <sub>2</sub> /Sb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ile modifiye CPE	CV, AMP	B:36 $\mu$ M, C:500 mV(DKE)	Zaitseva ve ark., 2002.
<b>Azure A</b>	Screen printed karbon elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, FIA	A:0,5 - 100 $\mu$ M, B:0,2 $\mu$ M (FIA için) C: 500 mV(Ag/AgCl)	Gao ve ark., 2004.
	Polidiallildimetilamonyumklorür ve MWCNT tutturulmuş GCE yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, AMP	A:0,6 - 600 $\mu$ M, B:0,2 $\mu$ M	Gao ve ark., 2010.
	GCE yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, AMP	A: $1 \times 10^{-5}$ - $8 \times 10^{-3}$ M, B: $5 \times 10^{-6}$ M C:410 mV(DKE)	Li ve ark., 2003.
<b>Azure B</b>	Screen printed karbon elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, FIA	A:0,5 - 100 $\mu$ M, B:0,2 $\mu$ M (FIA için) C:400 mV(Ag/AgCl)	Sha ve ark., 2004.
	GCE yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV	C:460 mV, k: $10^3$ l/mol.s civarında	Cai ve Xue, 1997.
	Polidiallildimetilamonyumklorür ve MWCNT tutturulmuş GCE yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, AMP	A:0,2 - 650 $\mu$ M, B:0,07 $\mu$ M	Gao ve ark., 2010.

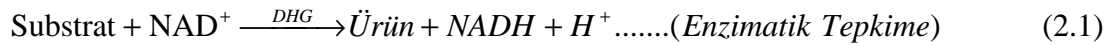
<b>Tiyonin</b>	Screen printed karbon elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, FIA	A:5 - 100 $\mu$ M, B:3 $\mu$ M (FIA için) C:300 mV(Ag/AgCl)	Gao ve ark., 2003.
	MWCNT tutturulmuş karbon iyonik sıvı elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, AMP	A:0,8 - 422 $\mu$ M, B:0,26 $\mu$ M C:190 mV (karbon iyonik sıvı elektroda göre)	Mai ve ark., 2010.
	Düzenli mezoporöz karbon tutturulmuş GCE yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, AMP	A:3,4x10 <sup>-6</sup> - 8,5x10 <sup>-4</sup> M, B:5,1x10 <sup>-8</sup> M C:592 mV (GCE'ye göre)	Qi ve ark., 2009.
<b>Metilen Yeşili</b>	GCE yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, AMP	A:0.5 - 10 mM, B:1.0x10 <sup>-5</sup> M C:400 mV(yalın GCE'ye göre)	Zhou ve ark, 1996.
	GCE yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, AMP	A:5,6 - 420 $\mu$ M, B: 3,8 $\mu$ M C:650 mV (yalın GCE'ye göre)	Dai ve ark., 2008.
	MY adsorplanmış niyobyum oksit modifiye silika jel ile CPE	CV, AMP, FIA	A:5x10 <sup>-4</sup> - 4x10 <sup>-3</sup> M(AMP için) A:6x10 <sup>-5</sup> - 1x10 <sup>-3</sup> M, B:8,2x10 <sup>-6</sup> M (FIA )	Delucca ve ark., 2002.
<b>Toluidin Mavisi</b>	GCE yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, APM, RDE	A:5x10 <sup>-6</sup> - 2x10 <sup>-3</sup> M, B:5x10 <sup>-7</sup> M C: 470 mV (GCE'ye göre)	Cai ve Xue, 1998.
	Karbon fiber mikrosilindir elektroda adsorpsiyonla	CV	A:4x10 <sup>-5</sup> - 1,5x10 <sup>-3</sup> M	Ju ve ark., 1996.
	Silikajele kovalent bağlı TM ile modifiye CPE	CV, RDE, FIA	B:1,2 $\mu$ M; k:3,9x10 <sup>3</sup> l/mol.s	Munteanu ve ark., 2003.
	MWCNT modifiye edilmiş GCE yüzeyinde elektropolimerizasyon	CV, AMP	A:2x10 <sup>-6</sup> -4,5x10 <sup>-3</sup> M, B:5x10 <sup>-7</sup> M C:650 mV(yalın GCE'ye göre)	Zeng ve ark., 2006.
MWCNT tutturulmuş pirolitik grafit elektrot yüzeyinde adsorpsiyon	CV, AMP	A:50-500 $\mu$ M, B:15 $\mu$ M	Lawrence ve Wang, 2006.	

A: kalibrasyon aralığı, B: Belirtme alt sınırı, C: NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinin yalın elektrotlara göre negatife kayma miktarı k: elektron transfer katsayısı, CV: döngüsel voltametri; DPV: Diferansiyel puls voltammetrisi AMP:Amperometri; RDE: döner disk elektrot sistemi, FIA: Akışa enjeksiyon sistemi, GCE: Camımsı karbon elektrot, CPE: Karbon pasta elektrot, ZrP: Zirkonyum fosfat, MWCNT: Çok çepirli karbon nanotüp, SWCNT:Tek çepirli karbon nanotüp

**2.1.2. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesine Dayalı Geliştirilen Biyosensör Uygulamaları**

Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir duyarğacı bulunan ve bir fizikokimyasal çevirici ile birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarı ile orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir. Biyosensör sistemi üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar, seçici tanıma mekanizmasına sahip “biyomolekül, biyoajan”, bu biyoajanın incelenen madde ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürülebilen “çevirici” ve “elektronik” bölümlerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren, duyarlı biyolojik ajandır. Bir başka deyişle biyosensörler, genel olarak analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemi ile kombinasyonu sonucu oluşturulurlar (Bilgiustam, 2010).

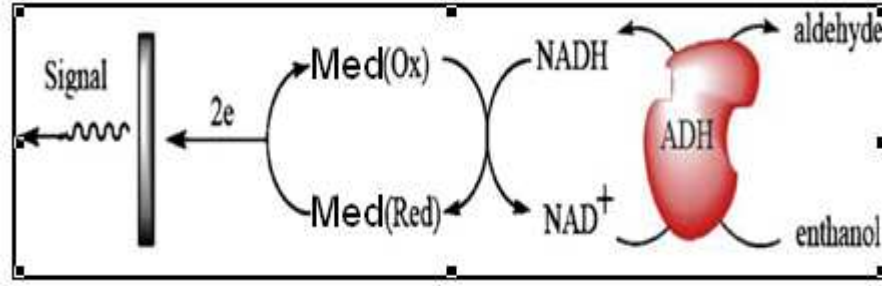
Son yıllarda modifiye elektrotlar kullanılarak  $NAD^+/NADH$  redoks çiftine dayalı amperometrik biyosensörler üzerine oldukça fazla çalışma yapılmıştır (Katakis ve Dominguez, 1997; Lobo ve ark., 1997).  $NADH$ 'ye bağlı ilk biyosensör, dehidrogenaz enzimleri varlığında substrat ile  $NAD^+$ 'nin enzimatik tepkimesi sonucu oluşan  $NADH$ 'nin direk temiz veya önışlem görmüş yalın elektrot yüzeyinde direk elektrokimyasal yükseltmesine dayalı olarak geliştirilmiştir (Tepkime 2.1)



Bu sensörler ilk geliştirilen biyosensör (first-generation biosensor) olarak adlandırılmıştır. Bu tür biyosensörün en büyük dezavantajı, daha önce  $NADH$ 'nin yalın elektrotlardaki yükseltgenmesi kısmında bahsedilen yüksek aşırı potansiyel, elektrot yüzeyinin kirlenmesi ve düşük tekrarlanabilirlik ve kararlılıktır. Bunun için  $NADH$ 'ye bağlı ikinci bir biyosensör geliştirilmiştir (Second generation biosensor). Bu tür sensörde,  $NADH$ 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanılan redoks mediyatörle modifiye elektrotlar hazırlanarak, bu elektrotlarla enzimatik rekasiyon sonucu oluşan  $NADH$ 'nin ölçümü esas alınmıştır. İkinci geliştirilen biyosensör mekanizması sırasıyla, daha önce verilen tepkime (2,1), (1,9), (1,10) ve (1,11) ile ifade edilmektedir.

Üçüncü geliştirilen biyosensörler (third generation biosensor) olarak adlandırılan floavoenzimlere bağlı biyosensörlerde ise enzimin aktif merkezi ve elektrot arasında direk bir elektron transferi gerçekleşmektedir. Bu biyosensör türlerinden daha çok ikinci geliştirilen biyosensör kullanılmıştır (Lobo ve ark., 1997).

Özellikle, fenotiyazin türü boyar maddelerle modifiye elektrotlar kullanılarak alkol, karbonhidrat ve glutamat biyosensörü geliştirilmiştir (Çizelge 2.2.). NADH'ye bağlı biyosensör mekanizması alkol biyosensörü için aşağıdaki mekanizmaya göre açıklanmıştır (şekil 19). Alkol biyosensöründe redoks mediyatörlerle modifiye edilmiş elektrot yüzeyine alkol dehidrogenaz (ADH) veya alkol oksidaz enzimleri tutturulur ve kofaktör  $NAD^+$  varlığında alkol bu enzimlerle enzimatik bir tepkimeye girerek aldehit ve  $NAD^+$ 'nın indirgenmiş formunu (NADH) oluşturur.



Şekil 19. Redoks mediyatörle modifiye elektrot kullanılarak NADH'ye bağlı geliştirilen etanol biyosensörünün şematik gösterimi.

Oluşan NADH mediyatörle kimyasal tepkimeye girerek kendisi  $NAD^+$ 'ya yükseltgenirken, mediyatör indirgenmiş haline döner. Son olarak indirgenmiş formdaki mediyatörün elektrot yüzeyinde yükseltgenmiş formuna dönüşmesi sırasında oluşan akım kaydedilerek alkol dolaylı yoldan tayin edilmiş olur.

Glikoz, laktoz, vb. karbonhidratların ve glutamat gibi bir amino asit tuzunun biyosensör yapımında da benzer mekanizma izlenmiş, ancak enzim olarak sırasıyla glikoz dehidrogenaz (GDH), laktat dehidrogenaz (LDH) ve glutamat dehidrogenaz (GIH) kullanılmıştır (Çizelge2.2).

Çizelge 2.2. Bazı biyosensör çalışmalarında kullanılan fenotiyozin grubu redoks mediyatörler

<b>Kullanılan Elektrot</b>	<b>Enzim</b>	<b>Analit</b>	<b>Açıklama</b>	<b>Kaynak</b>
MM'nin laponit jel tutturulmuş GCE yüzeyinde elektropolimerizasyonu	ADH, LDH	Etanol ve laktat	B:1 mM (laktat için) ve 25 mM (etanol için)	Cosnier ve Lous, 1996.
Tiyonin adsorplanmış SWCNT'nin GCE yüzeyine tutturulması	GIDH	Glutamat	A:0,5-400 mM, B:0,1 mM	Meng ve ark., 2009.
Au elektrot yüzeyinde MM'nin elektropolimerizasyonu	GDH	Glukoz	A:1-4 mM	Silber ve ark., 1996.
TM adsorplanmış pirolitik grafit elektrot	LDH	Laktat	A: $1 \times 10^{-6}$ - $6 \times 10^{-5}$ M, B: $4 \times 10^{-7}$ M	Villamil ve ark., 1997.
TM'nin grafit elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyonu	GDH	Glukoz	A: $5 \times 10^{-5}$ - $3 \times 10^{-3}$ M	Zhou ve ark., 2008.
Fenotiyazin (TM) ve fenoksazin (MdM, NM, BKM) modifiye CPE	ADH	Etanol	A:10-100 $\mu$ M, $5 \times 10^{-6}$ M	Lobo ve ark., 1996.

A: Kalibrasyon aralığı, B: Belirte alt sınırı, GCE: Camımsı karbon elektrot, CPE: Karbon pasta elektrot, SWCNT: Tek çeperli karbon nanotüp ADH: Alkol dehidrogenaz, GIDH: Glutamat dehidrogenaz, GDH: Glukoz dehidrogenaz, LDH: Laktat dehidrogen



### **BÖLÜM 3 MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1.Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(% 95-97, d:1,83 g/ml ), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (% 85, d:1,71 g/mL), HCl (% 37, d:1,19 g/mL), NaOH, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, NaNO<sub>3</sub>, alümina (0.5 µm) Alfa Aesar), Metilen Mavisinin klorür tuzu (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S.xH<sub>2</sub>O, MM), Azur A'nın klorür tuzu (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>SCl, AzA), Sigma firmasından, NADH'nin disodyum tuzu (Na<sub>2</sub>NADH), etanol (J.T. Baker firmasından), argon gazı ve çözeltileri hazırlamak için kullanılan bidistile safsu Milli-Q (Millipore, Bedford, USA) cihazından sağlandı.

#### **3.2.Kullanılan Cihazlar**

Voltammetrik ve amperometrik ölçümler, Compactstat Electrochemical Interface (Ivium Technologies, Eindhoven, the Netherkands) cihazları kullanılarak gerçekleştirildi.

Voltammetrik ölçümler, 3 mm çapında GCE çalışma elektrodu, platin tel yardımcı elektrot, Ag/AgCl (doygun KCl) elektrodu karşılaştırma elektrodu olacak şekilde üçlü elektrot sisteminde yapıldı. Çalışma elektrodu GCE alümina ile parlatıldıktan sonra 3dk sırasıyla etanol ve saf su içerisinde ultrasonik banyoda (Bandelin Sonorex RK 100H Ultrasonic bath) bekletildi. Fotoelektrokatalitik çalışmalarda elektrot yüzeyi Fiber optikli 250 W halojen lamba (fiber optic illuminator 250 W halogen bulb with Foi-5-light guide, Titan Tool Supply Inc., USA) ile aydınlatıldı. Tüm çözeltilerin pH'ı kombine cam elektrotlu (Hana HI 1332), Hana HI 221 pH metre kullanılarak ayarlandı. Hazırlanan standart NADH çözeltilerinin, 340 nm dalga boyunda absorbanlarını ölçmek için Spektrofotometre (Perkin Emler Lambda 35 Uv-Vis Spectrometer) cihazı kullanıldı.

#### **3.3.Yöntem**

Öncelikle çalışılacak boyar maddelerin 10<sup>-3</sup>M'lık (metilen mavisi) ve 10<sup>-2</sup> M'lık (Azur A) stok çözeltileri hazırlandı. Her biri 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren; 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ve pH'ı 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 olan 0,1 M fosfat tamponu destek elektrolitlerinde çalışıldı. Voltammogramlar, oksijeni uzaklaştırmak için destek elektrolitten 5dk argon gazı geçirildikten sonra alındı.

Metilen mavisi (MM) ve Azur A (AzA) mediyatörleri ile de modifiye elektrot hazırlanılarak, NADH'nin bu modifiye elektrotlarla elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenme çalışmaları başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Bu mediyatörlere ilişkin amperometrik ve fotoamperometrik çalışmalar da gerçekleştirildi. NADH'ye en iyi yanıtı veren modifiye elektrodu belirlemek için seçilen redoks mediyatörlerin GCE yüzeyinde

elektropolimerizasyonuna destek elektrolitin, monomer derişiminin, döngü sayısının ve potansiyel çalışma aralığının etkisi incelendi.

#### **3.4. Stok NADH Çözeltisinin ( $5 \times 10^{-2}$ M) Hazırlanması**

NADH'nin disodyum tuzundan (MA:709,5 g/mol) 0,1774 g tartılarak, 5 mL argon gazı geçirilmiş pH 7,0 fosfat tamponunda çözüldü. Hazırlanan çözeltiler, kullanma süresi hariç ağzı kapalı renkli şişelerde, karanlık ve buzdolabında muhafaza edildi. Ara ve standart çözeltiler, bu stok çözeltiden belli hacim alınarak argon gazı geçirilmiş pH 7,0 fosfat tamponu ile seyreltilerek hazırlandı. Tüm NADH çözeltileri günlük olarak taze hazırlandı. Seyreltilen tüm NADH çözeltilerinin, 340 nm dalga boyunda bir spektrofotometreden absorpsanları okunarak, molar absorpsiyon katsayısı değeri yordamıyla ( $A=\epsilon lC$ ) derişimleri kontrol edildi.

#### **3.5. Stok Metilen Mavisi (MM) Çözeltisinin ( $1 \times 10^{-3}$ M) Hazırlanması**

Metilen mavisi klorür- x-hidrat'dan ( $x=2-3$ ) (dihidrata göre MA: 354,5 g/mol alınmıştır) 0,0177 g tartılıp, saf su veya 0,1 M  $\text{NaNO}_3$  içeren pH 5,0 fosfat çözeltisinde çözümlenerek 50 ml'lik balon jojenin çizgisine kadar tamamlandı.

#### **3.6. Stok Azur A (AzA) Çözeltisinin ( $1 \times 10^{-2}$ M) Hazırlanması**

AzA'dan (MA: 291,8 g/mol) 0,1459 g tartılıp, saf su ve 0,1 M  $\text{NaNO}_3$  içeren pH 5,0 fosfat çözeltisinde çözümlenerek 50 ml'lik balon jojenin çizgisine kadar tamamlandı.

#### **3.7. Elektropolimerizasyon Esnasında Kullanılan Destek Elektrolit Çözeltilerinin Hazırlanması**

##### **3.7.1. 0,1 M $\text{NaNO}_3$ İçeren 0,1 M $\text{H}_3\text{PO}_4$ Çözeltisinin Hazırlanması**

% 85'lik yoğunluğu 1,71 g/ml olan  $\text{H}_3\text{PO}_4$ 'den, bir pipetle 6,74 ml alınıp ve  $\text{NaNO}_3$ 'dan 8,499 g tartılıp az miktar saf su içeren 1 L'lik balon jojeye ilave edilerek yine saf su ile balon jojenin çizgisine kadar tamamlandı.

##### **3.7.2. 0,1 M $\text{NaNO}_3$ İçeren 0,1 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ Çözeltisinin Hazırlanması**

% 95-97'lik yoğunluğu 1,83 g/ml olan  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'den, bir pipetle 5,58 ml alınıp ve  $\text{NaNO}_3$ 'dan 8,499 g tartılıp az miktar saf su içeren 1 L'lik balon jojeye ilave edilerek yine saf su ile balon jojenin çizgisine kadar tamamlandı.

#### **3.8. Fosfat Tampon ve Fosfat Çözeltilerinin Hazırlanması**

pH 2-10 arasında değişen ve 0,1 M  $\text{NaNO}_3$  içeren fosfat tampon ve fosfat çözeltileri; aşağıdaki çözeltilerin uygun karışımları pH metreden kontrol edilerek hazırlandı.

**3.8.1. 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren 0,1 M NaOH Çözeltisinin Hazırlanması**

4 g NaOH ve 8,449 g NaNO<sub>3</sub> tartılarak, az miktar suda çözüldükten sonra 1 L'lik balon jopenin çizgisine kadar saf su ile tamamlandı.

**3.8.2. 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Çözeltisinin Hazırlanması**

15,602 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 8,449 g NaNO<sub>3</sub> tartılarak, az miktar suda çözüldükten sonra 1 L'lik balon jopenin çizgisine kadar saf su ile tamamlandı.

**3.8.3. 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Çözeltisinin Hazırlanması**

17,799 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 8,449 g NaNO<sub>3</sub> tartılarak, az miktar suda çözüldükten sonra 1 l'lik balon jopenin çizgisine kadar saf su ile tamamlandı.

**3.9. NADH'nin Elektrokatalitik ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesinde****Kullanılan Destek Elektrolit Çözeltisinin Hazırlanması**

pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi NaNO<sub>3</sub> içermeyecek şekilde yukarıdaki çözeltilerin (nitratsız çözeltileri) uygun karışımları pH metre ile kontrol edilerek hazırlandı.

**3.10. Poli-MM Modifiye GCE Hazırlanması****3.10.1. En Uygun Destek Elektrolitin Belirlenmesi**

DeneySEL çalışmalarında, her biri 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren; 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ve pH'ı 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 olan 0,1 M fosfat tamponu ve fosfat çözeltileri destek elektrolitlerinde 0,05 mM MM'nin GCE üzerinde elektropolimerizasyon işlemleri, -0,7 ile +1,2 potansiyel aralığında ve 100 mV/s tarama hızında gerçekleştirilerek poli-MM/GCE'ler hazırlanmıştır.

Poli-MM modifiye elektrodun karakterizasyonu; her bir destek elektrolit için elde edilen Poli-MM/GCE'nin voltammetrik davranışı, pH'sı 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponu ortamında, 0,8 ile +0,8 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında, döngüsel voltammogramları kaydedilerek incelendi.

Poli-MM modifiye elektrotların NADH ortamındaki elektrokimyasal davranışının incelenmesi; Her bir destek elektrolit için elde edilen Poli-MM/GCE'nin, 0,4 mM NADH içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu ortamında, -0,8 ile +0,8 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında döngüsel voltammogramları kaydedildi. Yalın GCE'yle de 0,4 mM NADH'nin elektrokimyasal davranışı aynı koşullarda incelenerek Poli-MM/GCE ile karşılaştırıldı.

**3.10.2. En Uygun Monomer Derişiminin Belirlenmesi**

0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren 0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu ortamında MM derişimi 0,005 ile 0,1 mM arasında farklı değerlerde olacak şekilde hazırlanan çözeltilerin -0,7 ile +1,2

potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında, 10 döngü sayılı voltammogramları alınarak, Poli-MM/GCE'ler elde edildi.

MM modifiye elektrodun karakterizasyonu ve poli-MM modifiye elektrotların NADH ortamındaki elektrokimyasal davranışının incelenmesi en uygun destek elektrolitin belirlenmesi basamağındaki gibi gerçekleştirildi.

### **3.10.3. En Uygun Döngü Sayısının Belirlenmesi**

9,5 mL'lik destek elektrolite MM derişimi 0,05 mM olacak şekilde  $10^{-3}$  M stok MM çözeltisinden 500  $\mu$ L ilave edildi. -0,7 ile +1,2 potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında, farklı döngü sayılarında döngüsel voltammogramlar alınarak, Poli-MM/GCE'ler elde edildi.

MM modifiye elektrodun karakterizasyonu ve poli-MM modifiye elektrotların NADH ortamındaki elektrokimyasal davranışının incelenmesi en uygun destek elektrolitin belirlenmesi basamağındaki gibi gerçekleştirildi.

### **3.10.4. En Uygun Potansiyel Aralığının Belirlenmesi**

Poli-MM/GCE hazırlamak için 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren 9,5 mL'lik 0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu destek elektrolitine, MM derişimi 0,05 mM olacak şekilde 500  $\mu$ L  $10^{-3}$  M stok MM'den ilave edilerek, 100 mV/s tarama hızında, 10 döngü sayısında, anodik bölgenin potansiyel değeri 600 ile 1600 mV arasında değiştirilerek voltammogramlar kaydedildi.

MM modifiye elektrodun karakterizasyonu ve poli-MM modifiye elektrotların NADH ortamındaki elektrokimyasal davranışının incelenmesi en uygun destek elektrolitin belirlenmesi basamağındaki gibi gerçekleştirildi.

## **3.11. Poli-AzA Modifiye GCE Hazırlanması**

### **3.11.1. En Uygun Destek Elektrolitin Belirlenmesi**

DeneySEL çalışmalarda, her biri 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren; 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ve pH'ı 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 olan 0,1 M fosfat tamponu ve fosfat çözeltileri destek elektrolitlerinde 0,03 mM AzA'nın GCE üzerinde elektropolimerizasyon işlemleri, -0,7 ile +1,2 potansiyel aralığında ve 100 mV/s tarama hızında gerçekleştirilerek poli-AzA/GCE'ler hazırlanmıştır.

Poli-AzA modifiye elektrodun karakterizasyonu; her bir destek elektrolit için elde edilen Poli-AzA/GCE'nin voltammetrik davranışı, pH'sı 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponu ortamında, 0,8 ile +0,8 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında, döngüsel voltammogramları kaydedilerek incelendi.

Poli-AzA modifiye elektrotların NADH ortamındaki elektrokimyasal davranışının incelenmesi; her bir destek elektrolit için elde edilen Poli-AzA/GCE'nin, 0,4 mM NADH

içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu ortamında, -0,8 ile +0,8 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında döngüsel voltammogramları kaydedildi. Yalın GCE'yle de 0,4 mM NADH'nin elektrokimyasal davranışı aynı koşullarda incelenerek Poli-AzA/GCE ile karşılaştırıldı.

### **3.11.2. En Uygun Monomer Derişiminin Belirlenmesi**

0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren 0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu ortamında AzA derişimi 0,005 ile 0,1 mM arasında farklı değerlerde olacak şekilde hazırlanan çözeltilerin -0,7 ile +1,2 potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında, 10 döngü sayılı voltammogramları alınarak, Poli-AzA/GCE'ler elde edildi.

AzA modifiye elektrodun karakterizasyonu ve poli-AzA modifiye elektrotların NADH ortamındaki elektrokimyasal davranışının incelenmesi en uygun destek elektrolitin belirlenmesi basamağındaki gibi gerçekleştirildi.

### **3.11.3. En Uygun Döngü Sayısının Belirlenmesi**

9,7 mL'lik destek elektrolite AzA derişimi 0,03 mM olacak şekilde 10<sup>-2</sup> M stok AzA çözeltilisinden 300 µL ilave edildi. -0,7 ile +1,2 potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında, farklı döngü sayılarında döngüsel voltammogramlar alınarak, Poli-AzA/GCE'ler elde edildi.

AzA modifiye elektrodun karakterizasyonu ve poli-AzA modifiye elektrotların NADH ortamındaki elektrokimyasal davranışının incelenmesi en uygun destek elektrolitin belirlenmesi basamağındaki gibi gerçekleştirildi.

### **3.11.4. En Uygun Potansiyel Aralığının Belirlenmesi**

Poli-AzA/GCE hazırlamak için 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren 9,7 mL'lik 0,1 M pH 5.0 fosfat tamponu destek elektrolitine, AzA derişimi 0,03 mM olacak şekilde 300 µL 10<sup>-2</sup> M stok AzA'dan ilave edilerek, 100 mV/s tarama hızında, 10 döngü sayısında, anodik bölgenin potansiyel değeri 600 ile 1600 mV arasında değiştirilerek voltammogramlar kaydedildi.

AzA modifiye elektrodun karakterizasyonu ve poli-AzA modifiye elektrotların NADH ortamındaki elektrokimyasal davranışının incelenmesi en uygun destek elektrolitin belirlenmesi basamağındaki gibi gerçekleştirildi.

### **3.12. Modifiye Elektrotların Karakterizasyonu**

Tüm modifiye elektrotlar uygun koşullarda hazırlandıktan sonra saf su ile yıkanıp kullanıma hazır hale getirildi. Her bir modifiye elektrodun pH'ı 2 ile 9 arasında değişen 0,1 M fosfat tamponu veya fosfat çözeltilisi ortamında, -0,8 ile +0,8 V, potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında, döngüsel voltammogramları alınarak, modifiye elektrotların pik akım ve potansiyellerine pH'ın etkisi incelendi.

Her bir modifiye elektrodun voltammetrik davranışı pH'ı 3, 5, 6, 7, 8 ve 9 olan 0,1 M fosfat tamponu veya fosfat çözeltisi ortamında, tarama hızı 10-51200 mV arasında değişen farklı tarama hızlarında döngüsel voltamogramları (potansiyel aralığı, -0,8 ile +0,8 V) alınarak modifiye elektrodulara farklı pH'larda tarama hızının etkisi incelendi.

Her bir modifiye elektrodun voltammetrik davranışı 0,1 M fosfat tamponu ortamında, tarama hızı 50 mV/s tarama hızında 200 veya 300 döngü sayılı voltamogramları (potansiyel aralığı, -0,8 ile +0,8 V) alınarak modifiye elektroduların pik akımlarının döngü sayısı ile ne kadar azaldığı incelendi.

### **3.13. Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Elektrokatalitik Ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesinin İncelenmesi**

#### **3.13.1. Döngüsel Voltammetri Yöntemiyle**

Elde edilen modifiye elektrotlara ışığın etkisinin olup olmadığını tespit etmek için elde edilen her bir modifiye elektrodun 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda ve 50 mV/s tarama hızında elektrot yüzeyine 250 Watt'lık ışık düşürülerek ve düşürülmeden döngüsel voltammogramları kaydedildi.

Modifiye elektrotların NADH'ye fotoelektrokatalitik etki gösterip göstermediğini tespit etmek için, 0,4 mM NADH'nin 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda, her bir modifiye elektrot için ışıklı ve ışıksız ortamda döngüsel voltammogramları kaydedilmiştir.

#### **3.13.2. Amperometrik Yöntemle**

##### **3.13.2.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi**

Her bir modifiye elektrodun, 10 mL 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu içeren destek elektrolit ortamında uygulama potansiyeli -100 ile + 600 mV arasında değişen uygulama potansiyellerinde akım zaman eğrileri kaydedildi. Her bir potansiyelde akım yatışkan hal konumuna geldikten sonra, önce ortamda NADH yok iken yüzey ışıklandırılarak modifiye elektrodun akımının ışıkla etkilenip etkilenmediği incelendi. Sonra ortamdaki derişimi 0,2 mM olacak şekilde stok NADH çözeltisinden ( $5 \times 10^{-2}$  M) 40  $\mu$ L ilave edilip karıştırıldıktan sonra, çözelti karıştırılmaksızın NADH'nin akımı zamana karşı izlendi, belli bir süre sonunda ise yüzey tekrar ışıklandırılarak NADH'nin fotoamperometrik akımı izlendi. Karşılaştırma yapabilmek için aynı işlemler yalın GCE içinde tekrarlandı.

##### **3.13.2.2. En Uygun Potansiyelde Farklı Derişimlerde NADH'nin Elektrokatalitik ve Fotoelektrokatalitik Akım Değerlerinin Kaydedilmesi**

Her bir modifiye elektrot için bulunan en uygun potansiyelde, yine 10 mL 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu içeren destek elektrolit ortamında akım zaman eğrileri kaydedildi. Akım yatışkan hal konumuna geldikten sonra NADH'nin  $1 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-3}$  M aralığında

değişen derişimlerdeki akım-zaman eğrileri önce yüzey ışıklandırılmadan, sonra ışıklandırılarak kaydedildi. Bu değerlerden yararlanılarak hem elektrokatalitik hem de fotoelektrokatalitik metod için kalibrasyon grafiğı elde edildi.

**BÖLÜM 4****ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA****4.1.Modifiye Elektrotların Hazırlanması**

Modifiye elektrotların hazırlanmasında modifiye elektrodun elde edildiği en uygun koşuldan ziyade, modifiye elektrotların NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine verdiği en iyi yanıt dikkate alınarak optimum koşullar belirlendi. NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine en iyi yanıtı veren optimum modifiye elektrodu elde etmek için, öncelikle sırasıyla farklı destek elektrolit, monomer derişimi, döngü sayısı ve potansiyel çalışma aralıklarında (özellikle anodik potansiyel sınırı değiştirilerek) redoks mediyatörlerin GCE yüzeyinde elektropolimerizasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen modifiye elektrotların NADH'nin yükseltgenmesine verdiği elektrokatalitik yanıt incelendi.

**4.2.Poli-MM Modifiye GCE**

Poli-MM/GCE'nin hazırlanması esnasındaki destek elektrolitin NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine etkisini belirlemek için, 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ve pH'ı 2-10 arasında değişen fosfat tamponu veya fosfat çözeltisi destek elektrolitlerinde, 100 mV/s tarama hızında, 10 döngü sayısında, -0,7 ile +1,2 V potansiyel aralığında, 0,05 mM MM'nin döngüsel voltammogramları alınarak modifiye elektrotlar hazırlandı ve elde edilen poli-MM/GCE'lerin 0,4 mM NADH içeren pH'ı 7,0 fosfat tamponu ortamında döngüsel voltammogramı alınarak, NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi incelendi.

MM'nin de GCE yüzeyinde elektropolimerizasyonu asidik bölgelerde zorlaşırken bazik bölgelerde daha belirgin gözlenmiştir. Ancak, pH 5,0 ile 6,0 arasında elde edilen Poli-MM/GCE'lerin NADH'ye daha iyi elektrokatalitik etki gösterdiği pik akım yüksekliklerinden gözlenmiştir.

Şekil 20A, 0,05 mM MM'nin, 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ortamında ve GCE üzerinde elektropolimerizasyonuna ilişkin döngüsel voltammogramı göstermektedir. İlk döngüde 240 mV (anodik) ve 210 mV (katodik) da görülen tersinir piklerin monomerik MM'ne ait olduğu, ancak yaklaşık 950-1100 mV'da gözlenmesi gereken katyonik radikal oluşumuna ait tersinmez anodik pikin bu potansiyel aralığında görülmediği şekilden anlaşılmaktadır. Asidik ortamda bu potansiyel aralığında elektropolimerizasyonun çok iyi olmadığı sonucuna varılmıştır.

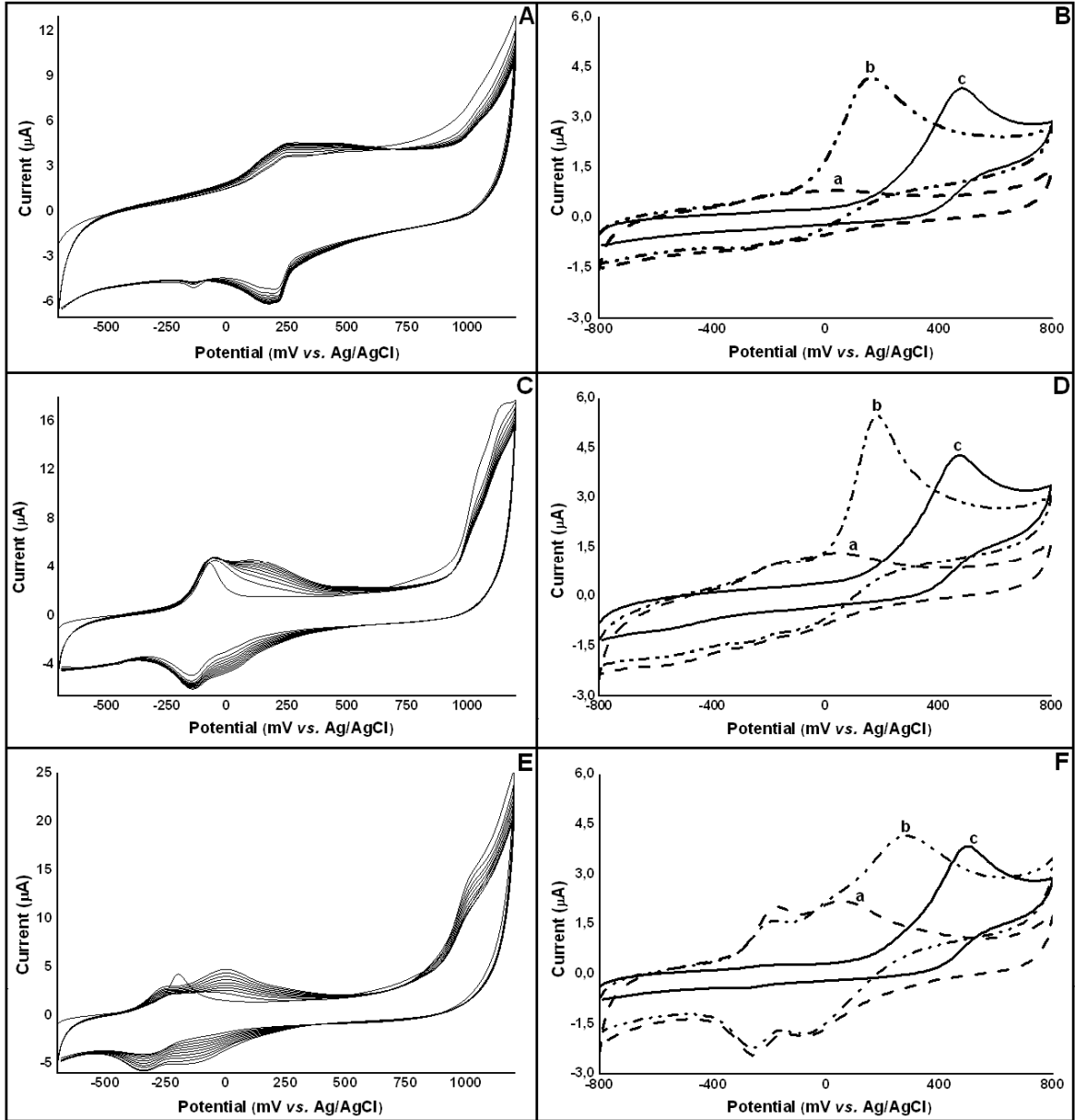


Şekil 20B, 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ortamında elde edilen Poli-MM/GCE'nin, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda NADH'siz ve 0,4 mM NADH ortamında, 50 mV/s tarama hızında ve (-0,8) – (+0,8) V potansiyel aralığında kaydedilen döngüsel voltammogramlarını göstermektedir. Ayrıca karşılaştırma yapabilmek için yalın GCE'de, 0,4 mM NADH'nin voltammogramı da kaydedilmiştir. Poli-MM/GCE'nin 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponundaki voltammogramında monomerik redoks çiftlerine ait piklerin çok iyi gözlenmediği, ancak polimerik türe ait anodik ve katodik piklerin, çok belirgin olmamakla birlikte sırasıyla yaklaşık +60mV ve - 80 mV'da gözlemlendiği tespit edilmiştir (Şekil 20B/a). NADH'nin yükseltgenme piki; yalın elektrotta yaklaşık 500 mV'da gözlenirken (Şekil 20B/c), Poli-MM modifiye elektrotta polimerik türe ait anodik pikin gözlemlendiği potansiyele yakın bir potansiyele (160 mV'a) kaymıştır (Şekil 20B/b). +160 mV'da görülen Poli-MM'ne ait modifiye elektrodun polimerik türüne ait anodik pik akımının NADH ortamında arttığı, ancak -80 mV da görülen katodik pikte herhangi bir değişim olmadığı şekilde görülmektedir. Sonuç olarak asidik ortamda elektropolimerizasyon çok iyi olmamasına rağmen, asidik ortamda elde edilen Poli-MM/GCE'nin NADH'ye karşı iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği saptanmıştır.

Şekil 20 C ve 0,05 mM MM'nin, 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,0 fosfat çözeltisindeki elektropolimerizasyonuna ilişkin döngüsel voltammogramlarını göstermektedir. İlk döngüde -70 mV (anodik) ve -130 mV'da (katodik) görülen tersinir piklerin monomerik MM'ne, yaklaşık 1140 mV'da görülen tersinmez anodik pikinde monomere ait katyonik radikalın oluşumuna ait olduğu literatür bilgileriyle desteklenmiştir (<sup>b</sup>Karyakin ve ark., 1999; Liu ve Mu, 1999). İkinci döngüde +130 mV'da yeni bir anodik pikin ve +40 mV'da da yeni bir katodik pikin oluştuğu ve döngü sayısının artmasıyla bu piklerin arttığı şekilden görülmektedir. Aynı şekilde 1050 mV'da ki pikin ise azaldığı görülmektedir. Bu yeni oluşan pikler, MM'nin GCE yüzeyinde elektropolimerizasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir.

Şekil 20 D ise pH 5,0'de elde edilen Poli-MM/GCE'nin NADH'ye elektrokatalitik yanıtını göstermektedir. Poli-MM/GCE'nin 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponundaki voltammogramında monomerik redoks çiftlerine ait pikler -160 mV (anodik) ve -260 mV (katodik) da polimerik türe ait anodik ve katodik pikler de, sırasıyla yaklaşık +60 mV ve - 80 mV da görülmektedir (Şekil 20D/a). NADH'nin yükseltgenmesi ise yaklaşık 190 mV'a kaymıştır (Şekil 20D/b). Sonuç olarak pH 5,0'de elde edilen modifiye elektrodun NADH'ye elektrokatalitik yanıtının, sülfirik asit ortamında elde edileninkinden daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

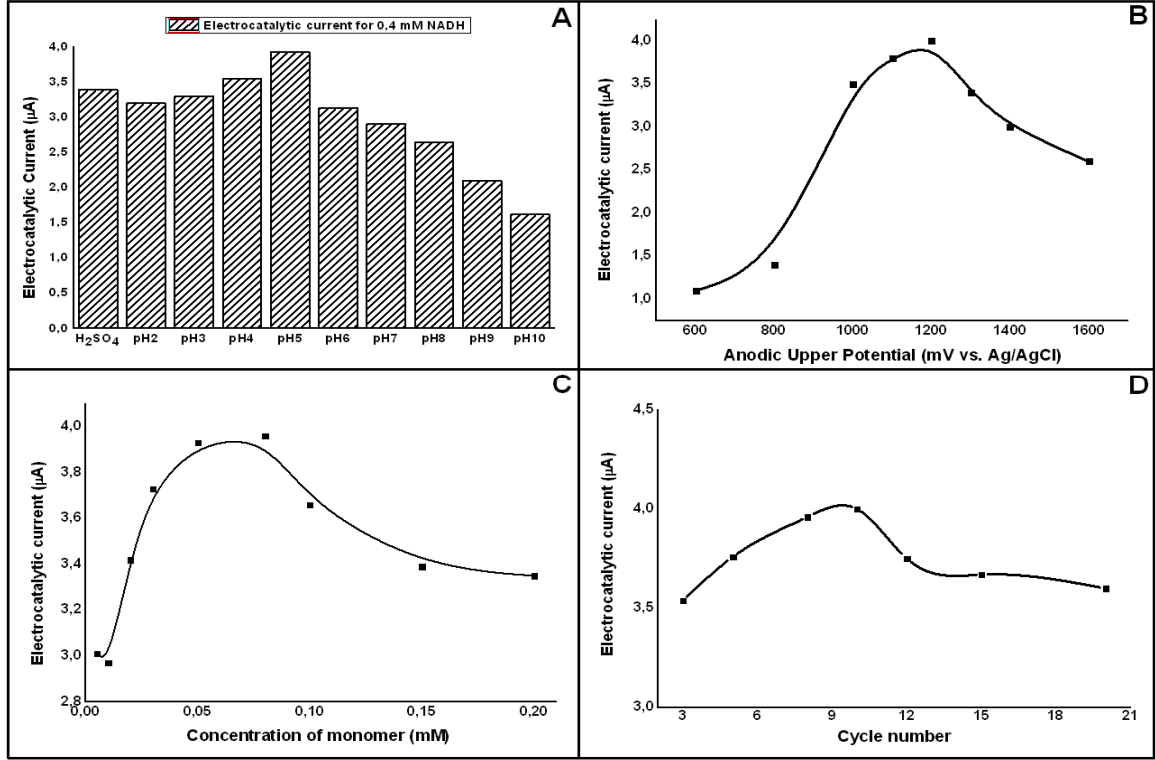
Şekil 20E ise en iyi elektropolimerizasyonun gerçekleştiği 0,1 M pH 10 fosfat çözeltisindeki MM'nin GCE üzerindeki elektropolimerizasyonunu göstermektedir. Ulaşılan bu sonuç literatürde belirtilen en iyi elektropolimerizasyon koşulu ile uyumludur (Liu ve Mu, 1999). İlk döngüde monomerik türe ait pikler -200 mV (anodik), -340 mV (katodik), katyonik radikalik türün oluşumuna ait anodik tersinmez pik ise 1140 mV'da gözlenmiştir. Döngü sayısının artmasıyla polimerik türe ait piklerin oluştuğu (yaklaşık +10 mV (anodik) ve -110 mV (katodik)) gözlenmiştir. Elde edilen modifiye elektrodun 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponundaki döngüsel voltammogramı ve NADH ortamındaki döngüsel voltammogramı Şekil 20F'de verilmiştir. Şekilden bu ortamda elde edilen modifiye elektrodun NADH'ye yanıtının çok iyi olmadığı; hem pik akım farklarından, hem de NADH'nin daha pozitif potansiyelde (yaklaşık 290 mV) yükseltgenmesinden anlaşılmaktadır. Bu olayın nedeni, bazik ortamda elektropolimerizasyonun çok iyi olmasından dolayı elektrot yüzeyindeki polimerik film kalınlığının ve dolayısıyla elektrot alanına düşen polimerik MM'nin miktarının fazla olmasına yorumlanmıştır. Bu da NADH'ye olan yanıtı sınırlamaktadır.



Şekil 20. 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren **A)** 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> **C)** pH 5,0 ve **E)** pH 10,0 olan fosfat çözeltisi destek elektrolitlerinde 0,05 mM MM'nin, ardışık olarak alınan döngüsel voltammogramları (tarama hızı: 100 mV/s). **B, D ve F)** Sırasıyla A, C ve E'den elde edilen poli-MM/GCE'nin (a) NADH yokluğunda ve (b) 0,4 mM NADH varlığındaki, (c) yalnız GCE'nin 0,4 mM NADH varlığındaki döngüsel voltammogramları (destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu; tarama hızı: 50 mV/s).

NADH'ye en iyi yanıtı veren modifiye elektrodu belirlemek için, pH'ı farklı fosfat çözeltisi destek elektrolitlerinde hazırlanan her bir modifiye elektrodun 0,4 mM NADH içeren pH 7,0 fosfat tamponu ortamında döngüsel voltammogramları kaydedildi. Elde edilen elektrokatalitik pik akımları elektropolimerizasyon esnasındaki destek elektrolite

karşı grafiğe geçirilmiş ve en iyi yanıtın pH 5,0 iken elde edildiği sonucuna varılmıştır (Şekil 20C). Böylece bu aşamayı izleyen deneylerde MM'nin elektropolimerizasyonu için 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,0 fosfat tamponu en uygun destek elektrolit olarak kullanılmıştır.



Şekil 21. Poli-MM/GCE'nin hazırlanması esnasındaki **A)** destek elektrolitin, **B)** anodik potansiyel sınırının, **C)** monomer derişiminin ve **D)** döngü sayısının, 0,4 mM NADH'nin elektrokatalitik pik akımına etkisi.

Poli-MM/GCE'nin hazırlanması esnasındaki anodik potansiyel sınırı değerinin, NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine etkisini belirlemek için, katodik potansiyel değeri -0,7 V'da sabit tutulup, anodik potansiyel değeri 0,6 ile 1,6 V arasında değiştirilerek, 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH'ı 5,0 olan fosfat tamponu destek elektrolitlerinde, 100 mV/s tarama hızında, 10 döngü sayısında, 0,05 mM MM'nin döngüsel voltammogramları kaydedildi. Daha sonra farklı potansiyel aralığında hazırlanan poli-MM/GCE'lerin pH'ı 7,0 fosfat tamponu ortamında 0,4 mM NADH'nin döngüsel voltammogramı alınarak, NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi incelendi.

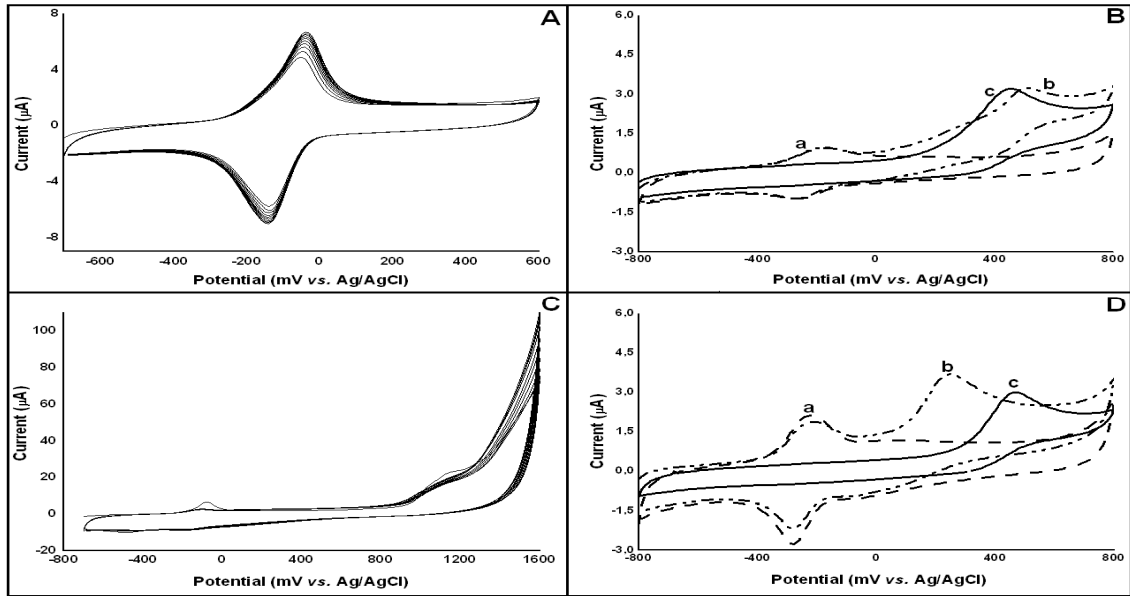
Elektropolimerizasyon işlemi -0,7 ile +0,6 V aralığında gerçekleştirildiğinde, -40 mV ve -140 mV'da MM'nin monomerik türüne ait redoks çiftinin gözlemlendiği, fakat polimerik türe ait yeni piklerin oluşmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 22A). Bunun nedeni polimerizasyon mekanizmasının yorumlanmasıyla açıklanabilir. Literatürde bahsedildiği gibi, MM'nin elektropolimerizasyon mekanizmasında, önce katyonik radikal formun oluşması ve oluşan radikal türlerin rezonans ile aromatik halkaya geçmesi ve C-C bağları yada C-N bağlarının oluşumu ile dimerleşme ve polimerleşme gerçekleşmektedir (<sup>a</sup>Karyakin ve ark., 1999; Karyakin ve ark., 1993; Liu ve Mu, 1999). Daha önce destek elektrolit belirlenmesinde yorumlanan Şekil 20C'de de görüldüğü gibi, radikalik tür yaklaşık 1140 mV'da gözlemlenmiştir. O halde -0,7 ile +0,6 V aralığında elektropolimerizasyon işleminin gerçekleşmemesi radikalik formun oluşması için gerekli olan potansiyelin uygulanmamış olmasından kaynaklanmaktadır. Şekil 22B ise bu elektrodun NADH'siz ve 0,4 mM NADH ortamındaki döngüsel voltammogramlarını göstermektedir. Elektropolimerizasyonun bu potansiyel aralığında gerçekleşmemesinden dolayı polimerik türe ait pikler gözlemlenmemiş, sadece adsorpsiyondan dolayı monomerik türlere ilişkin pikler gözlemlenmiştir (Şekil 22B/a). Bu elektrot ile NADH'nin elektrokimyasal davranışı incelendiğinde, elektrokatalitik etkinin gözlemlenmediği (Şekil 22B/b) ve NADH'nin büyük bir kısmının NADH'nin yalnız elektrotta yükseltildiği potansiyelde (yaklaşık 510 mV, Şekil 22B/c) yükseltildiği ortaya konmuştur.

Potansiyel aralığı -0,7 ile +1,2 V aralığında elde edilen Poli-MM/GCE'nin, NADH'siz ve 0,4 mM NADH ortamındaki döngüsel voltammogramı daha önce Şekil 20C'de verilmiştir. Bu elektrot ile NADH'nin elektrokimyasal davranışı incelendiğinde, elektrokatalitik etkinin çok iyi gözlemlendiği Şekil 20D'den görülmektedir. NADH yalnız elektrotta yaklaşık 500 mV'da yükseltgenirken, Poli-MM/GCE'de +190 mV'da yükseltgenmiştir. Böylece NADH'nin potansiyeli yaklaşık 370 mV daha negatife kaymıştır.

Şekil 22C'de ise anodik pik potansiyel aralığı 1600 mV kadar arttırıldığında O<sub>2</sub> çıkışına ait aşırı akımın olması polimerizasyonun oluşumuna zarar vermekte ve polimerik piklerin oluşumunu engellemektedir. Bu elektrot ile NADH'nin elektrokimyasal davranışı incelendiğinde, elektrokatalitik etkinin de çok iyi gözlemlenmediği Şekil 22D'de görülmektedir.

Elde edilen elektrokatalitik akımlar elektropolimerizasyon esnasında kullanılan anodik potansiyel sınır değerlerine karşı grafiğe geçirilmiş ve Şekil 21B elde edilmiştir.

Elektropolimerizasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan radikalik türün oluşum potansiyelinden (yaklaşık 1140 mV) daha düşük potansiyelerde ardışık döngüsel voltammogramlar alındığında, elde edilen Poli-MM/GCE'lerin NADH'ye karşı iyi bir elektrokatalitik etki göstermediği şekilden görülmektedir. En iyi elektrokatalitik etkinin, elektropolimerizasyon esnasında potansiyel aralığının -0,7 ile +1,2 V arasında elde edilen Poli-MM/GCE için gözlemlendiği şekilden görülmektedir. MM'nin elektropolimerizasyonu, anodik pik potansiyel değeri 1,2 V'dan daha büyük potansiyelerde gerçekleştiğinde, elde edilen Poli-MM/GCE'lerin NADH'ye elektrokatalitik etkisi gittikçe azalmıştır. Bunun nedeni, daha büyük potansiyelerde O<sub>2</sub> çıkışından dolayı polimerik türün bozulması şeklinde yorumlanabilir.



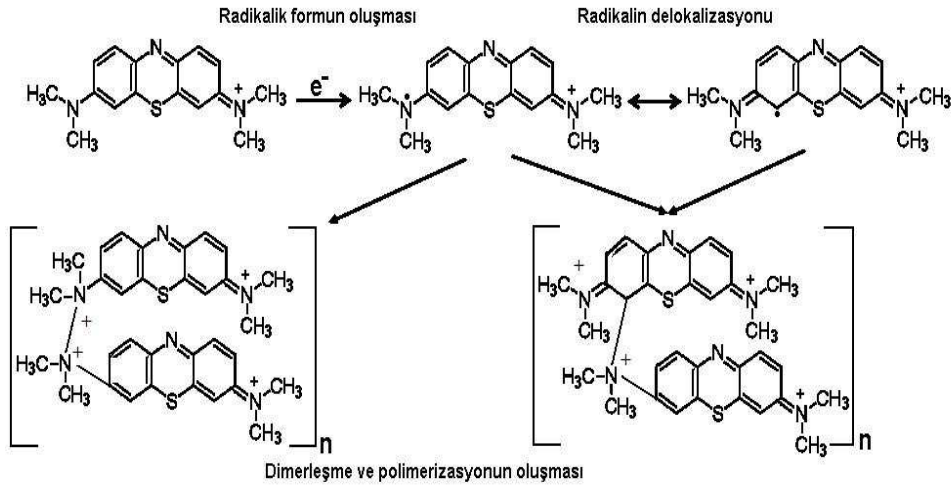
Şekil 22. 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,0 fosfat çözeltisi destek elektrolitinde **A**) (-0,7) – (+0,6) V **C**) (-0,7) – (+1,6) V potansiyel aralığında 0,05 mM MM'nin, ardışık olarak alınan döngüsel voltammogramları (tarama hızı: 100 mV/s). **B ve D**) Sırasıyla A ve C'den elde edilen poli-MM/GCE'nin (a) NADH yokluğunda ve (b) 0,4 mM NADH varlığındaki, (c) yalın GCE'nin 0,4 mM NADH varlığındaki döngüsel voltammogramları (destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu; tarama hızı: 50 mV/s).

Benzer deneyler monomer derişimi ve döngü sayısı için de tekrarlanmış, NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine en iyi yanıt veren modifiye elektrot; 0,05 mM monomer derişimi ortamında (Şekil 21C) ve 10 döngülü (Şekil 21D) voltammogramları alınarak hazırlandığında elde edilmiştir.

Sonuç olarak, NADH'ye en iyi yanıtı elde etmek için, MM'nin GCE yüzeyinde elektropolimerizasyonu basamağındaki en uygun koşullar; a) destek elektrolit: 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,0 fosfat tamponu, b) potansiyel aralığı: (-0,7) – (+1,2) V, c) monomer derişimi: 0,05 mM, d) döngü sayısı: 10 döngü, e) tarama hızı: 100 mV/s olarak belirlenmiştir.

#### 4.2.1. MM'nin Elektropolimerizasyon Mekanizması

MM'nin GCE yüzeyinde elektropolimerizasyonunun gerçekleşmesi için yüksek potansiyel değerlerinde (destek elektrolite bağlı olarak yaklaşık 1000-1200 mV) kararsız katyonik radikalik türün oluşumuna ait tersinmez bir anodik pikin oluşması gerekir (<sup>a</sup>Karyakin ve ark., 1999; Karyakin ve ark., 1993; Liu ve Mu, 1999). Oluşan radikalik form aromatik yapıda delokalize olur ve son olarak da olası dimerizasyon tepkimeleri radikal-radikal kaplingi yoluyla (C-N veya C-C) oluşur. Bu aşamayı, döngü sayısının artmasıyla polimerizasyon izler. Literatülerde de önerilen mekanizma aynı olup Şekil 23'de verilmiştir.



Şekil 23. MM'nin elektropolimerizasyon mekanizması.

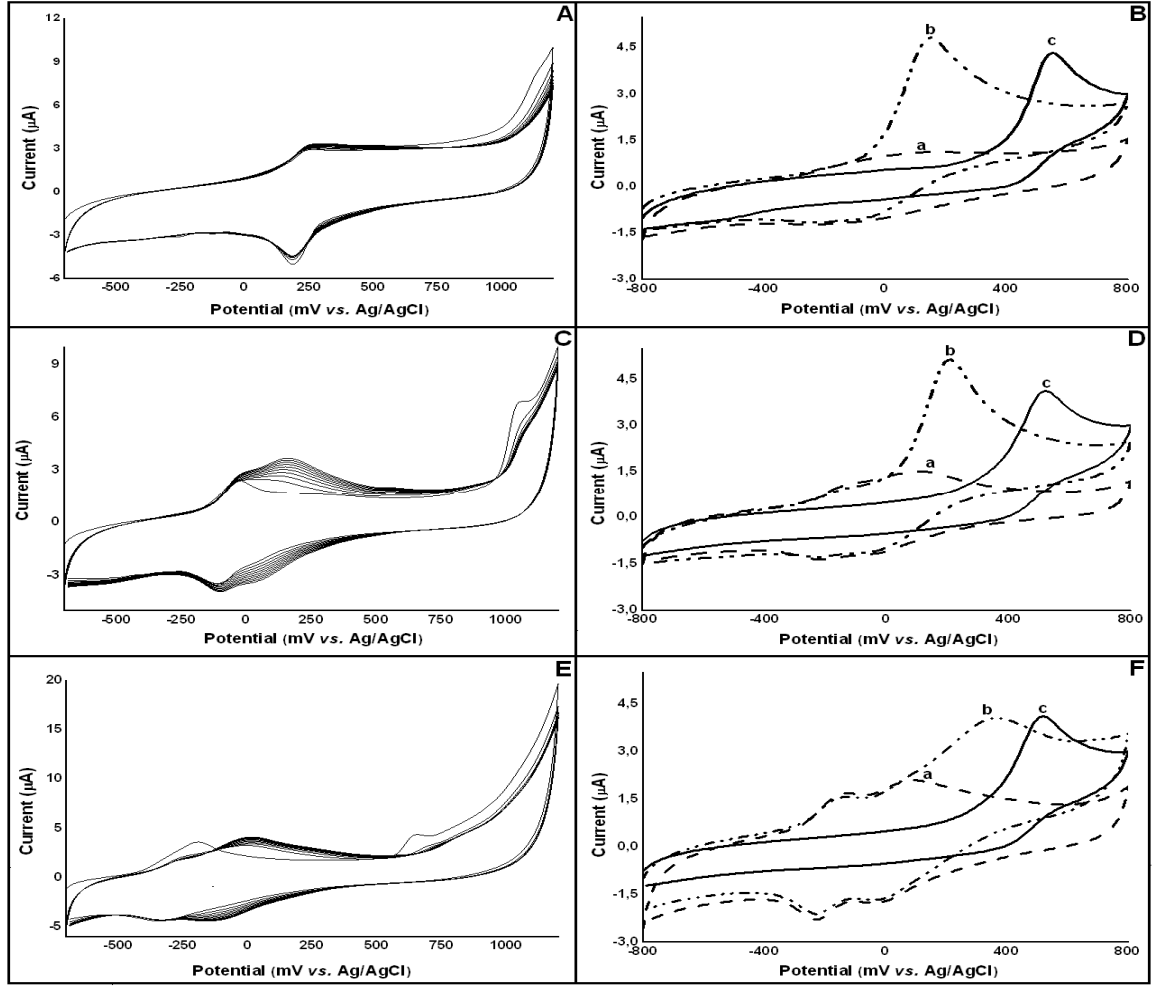
**4.3.Poli-AzA modifiye CKE**

AzA'nın elektropolimerizasyonunun optimum koşullarını belirlemek için MM'deki işlemler AzA için de tekrarlandı ve elde edilen bazı voltammogramlar ve sonuçlar sırasıyla Şekil 24, 25 ve 26'da verilmiştir.

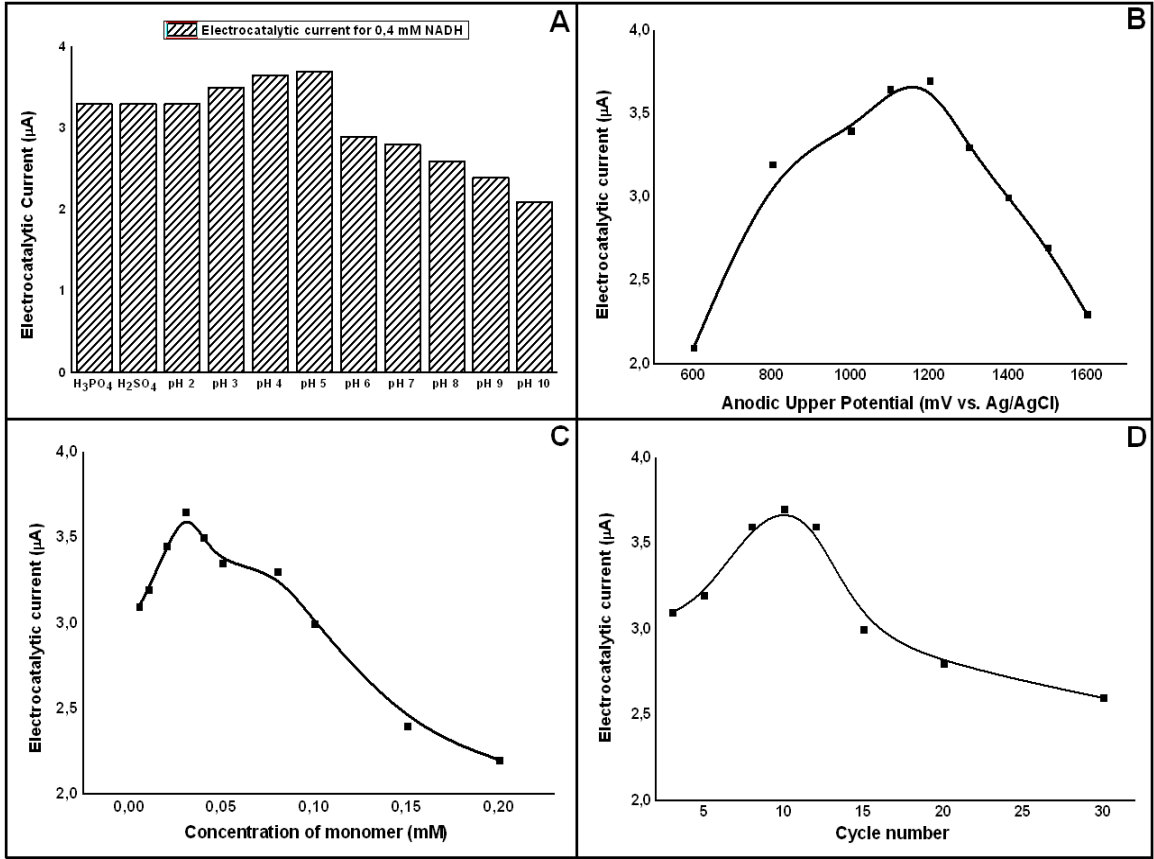
AzA'nın da GCE yüzeyinde elektropolimerizasyonu asidik bölgelerde zorlaşırken bazik bölgelerde daha belirgin gözlenmiştir. Ancak, pH 5,0 ile 6,0 arasında elde edilen Poli-AzA/GCE'lerin NADH'ye daha iyi elektrokatalitik etki gösterdiği pik akım yüksekliklerinden belirlenmiştir. NADH'ye en iyi yanıt veren poli-AzA/GCE, 0,03 mM AzA'nın (Şekil 25C), 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,0 fosfat çözeltisi destek elektrolitinde (Şekil 25A), -0,7 ile +1,2 V potansiyel aralığında (Şekil 26 ve 25B) ve 100 mV/s tarama hızında 10 döngülü (Şekil 24D) döngüsel voltammogramları kaydedilerek elde edilmiştir. AzA'nın elektropolimerizasyon mekanizması, daha önce MM'nin elektropolimerizasyonu için önerilen mekanizma ile benzer şekilde olduğu literatürde verilmiştir (Gao ve ark., 2004).

Poli-MM /GCE ve Poli-AzA /GCE modifiye elektrotların hazırlanması için elde edilen optimum değerler Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

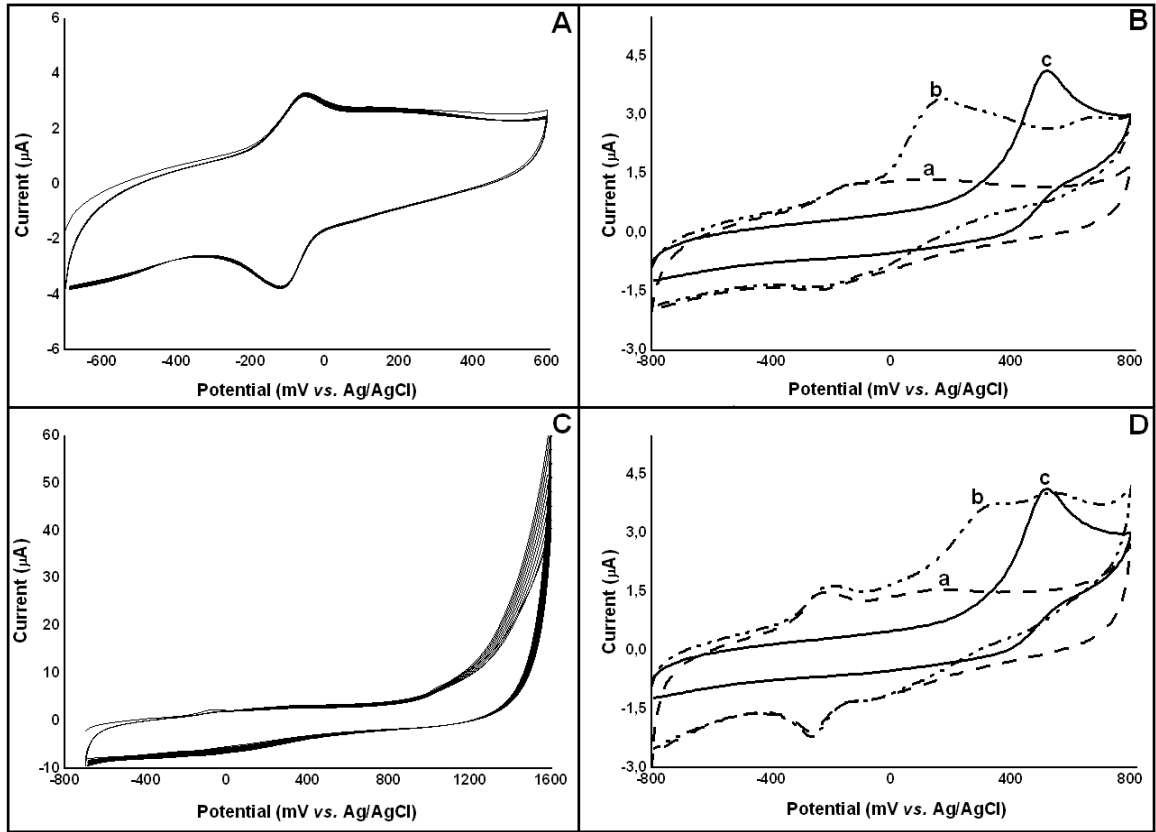




Şekil 24. 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren **A**) 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> **C**) pH 5,0 ve **E**) pH 10,0 olan fosfat çözeltisi destek elektrolitlerinde 0,03 mM AzA'nın, ardışık olarak alınan döngüsel voltammogramları (tarama hızı: 100 mV/s). **B**, **D** ve **F**) Sırasıyla A, C ve E'den elde edilen poli-AzA/GCE'nin (a) NADH yokluğunda ve (b) 0,4 mM NADH varlığındaki, (c) yalın GCE'nin 0,4 mM NADH varlığındaki döngüsel voltammogramları (destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu; tarama hızı: 50 mV/s).



Şekil 25. Poli-AzA/GCE'nin hazırlanması esnasındaki **A)** destek elektrolitin, **B)** anodik potansiyel sınırının, **C)** monomer derişiminin ve **D)** döngü sayısının 0,4 mM NADH'nin elektrokatalitik pik akımına etkisi.



Şekil 26. 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,0 fosfat çözeltisi destek elektrolitinde A) (-0,7) – (+0,6) V C) (-0,7) – (+1,6) V potansiyel aralığında 0,03 mM AzA'nın, ardışık olarak alınan döngüsel voltammogramları (tarama hızı: 100 mV/s). B ve D) Sırasıyla A ve C'den elde edilen poli-AzA/GCE'nin (a) NADH yokluğunda ve (b) 0,4 mM NADH varlığındaki, (c) yalın GCE'nin 0,4 mM NADH varlığındaki döngüsel voltammogramları (destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu; tarama hızı: 50 mV/s).

Çizelge 4.1. Modifiye elektrotların hazırlanması için elde edilen optimum değerler

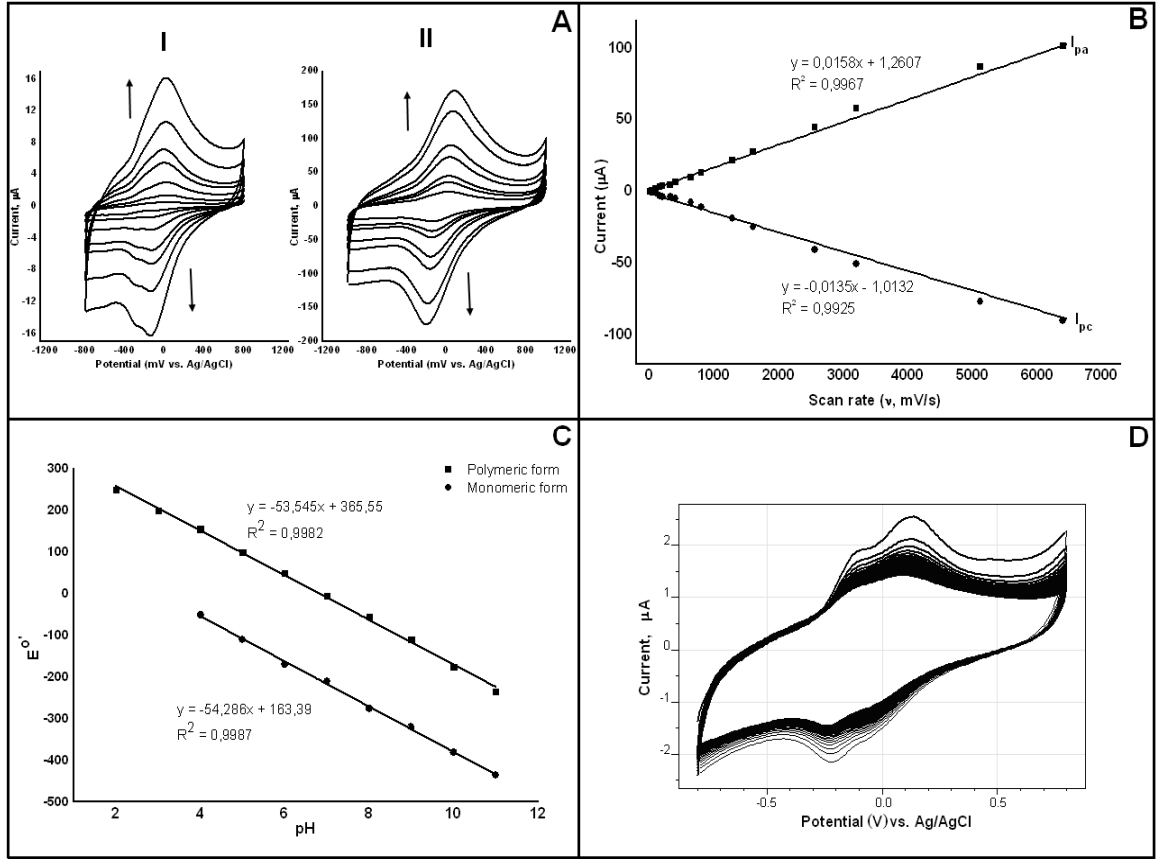
Modifiye elektrot türü	Destek elektrolit	Monomer derişimi	Döngü sayısı	Potansiyel aralığı
Poli-MM/GCE	0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren pH 5,0 fosfat çözeltisi	0,05 mM	10	(-0,7) – (+1,2) V
Poli-AzA/GCE	0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren pH 5,0 fosfat çözeltisi	0,03 mM	10	(-0,7) – (+1,2) V

#### **4.4.Modifiye Elektrotların Karakterizasyonu**

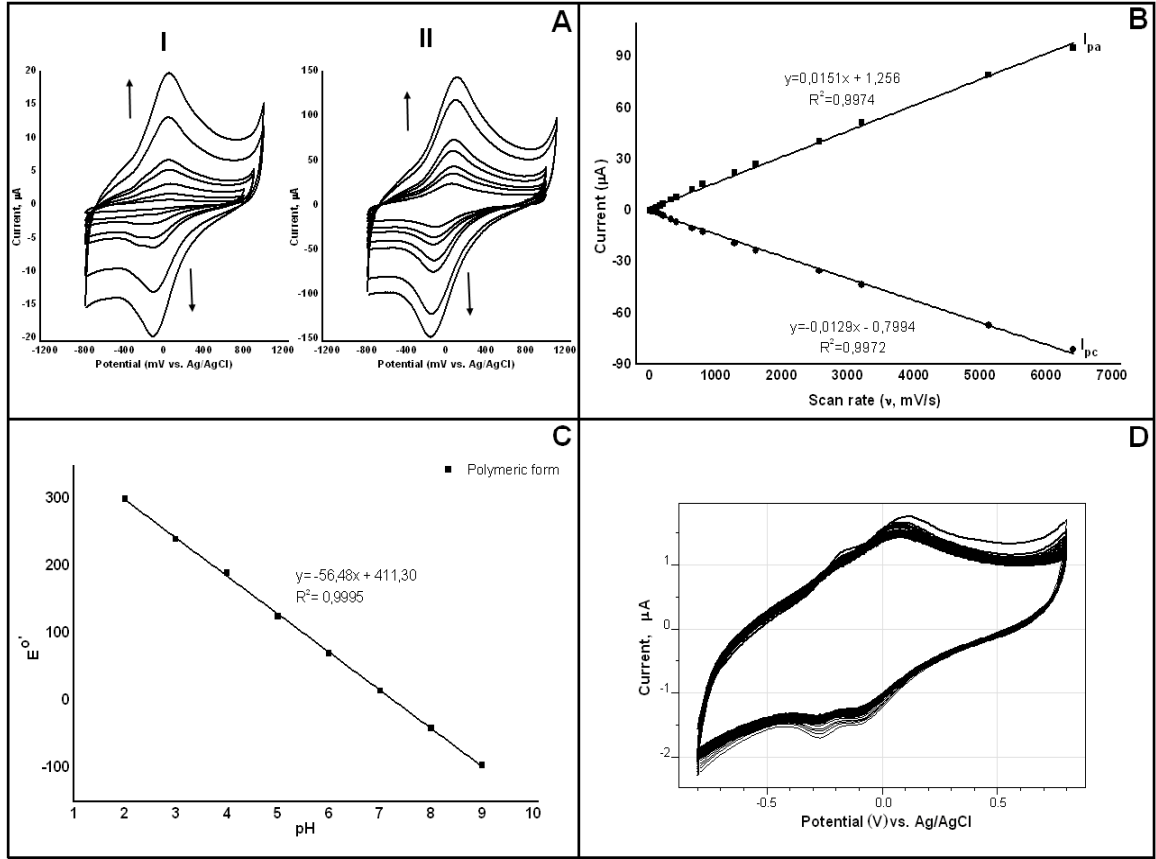
Optimum koşullarda hazırlanan herbir modifiye elektrodun, 20-6400 mV/s arasında değişen farklı tarama hızlarında ve 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda döngüsel voltammogramları kaydedilerek, tarama hızına karşı pik akımları değişimi incelendi. MM ve AzA modifiye elektrotların farklı tarama hızlarında elde edilen voltammogramları (A) ve bu voltammogramların değerlendirilmesiyle elde edilen pik akımlarına karşı tarama hızları grafiği (B) sırasıyla Şekil 27 ve 28’de verilmiştir. Şekillerden görüldüğü gibi fenotiyazin türü boyar maddelerle elde edilen modifiye elektrotların pik akımlarının ise tarama hızıyla doğrusal olarak değiştiği tespit edilmiştir.

Aynı şekillerin C ile gösterilen kısmında farklı pH’larda alınan voltammogramlardan polimerik ve monomerik türe ait anodik ve katodik pik potansiyelinin pH ile değişimi gösterilmiştir. Her bir modifiye elektrodun farklı pH’larda kaydedilen döngüsel voltammogramlarından formal potansiyel değerleri ( $E^0=[E_a+E_k]/2$ ) hesaplanarak pH’a karşı elde edilen grafiklerinde polimerik türün pH 2 ile 10 arasında pH arttıkça, eğimin -59 mV’a yakın değerlerde çıkması, bu modifiye elektrotların redoks olayında 2 elektron ve  $2H^+$ ’nin katıldığını yansıtmaktadır. Benzer yorumlar literatürde de yapılmıştır (Liu ve Mu, 1999; Cai ve Xue, 1997).

Yine şekillerin D ile gösterilen kısımda ise her bir modifiye elektrodun pH 7,0 fosfat tamponunda elde edilen 250-300 döngülü döngüsel voltammogramları kaydedilerek kararlı olup olmadıkları incelenmiştir. Modifiye elektrotların monomerik ve polimerik türüne ait piklerin döngü sayısının artmasıyla azaldığı, ancak azalmanın yaklaşık 150-200 döngüden sonra daha da azaldığı ve kararlı olduğu söylenebilir.



Şekil 27. Poli-MM/GCE'nin **A**) 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda ve farklı tarama hızlarındaki (**I**: 20, 50, 100, 160, 200, 400, 640; **II**: 800, 1280, 1600, 2560, 3200, 5120, 6400 mV/s) döngüsel voltammogramları, **B**) pik akımlarının tarama hızı ile değişimi, **C**)  $E^0'$  değerinin pH ile değişimi, **D**) 50 mV/s tarama hızındaki ardışık 300 döngülü voltammogramları.



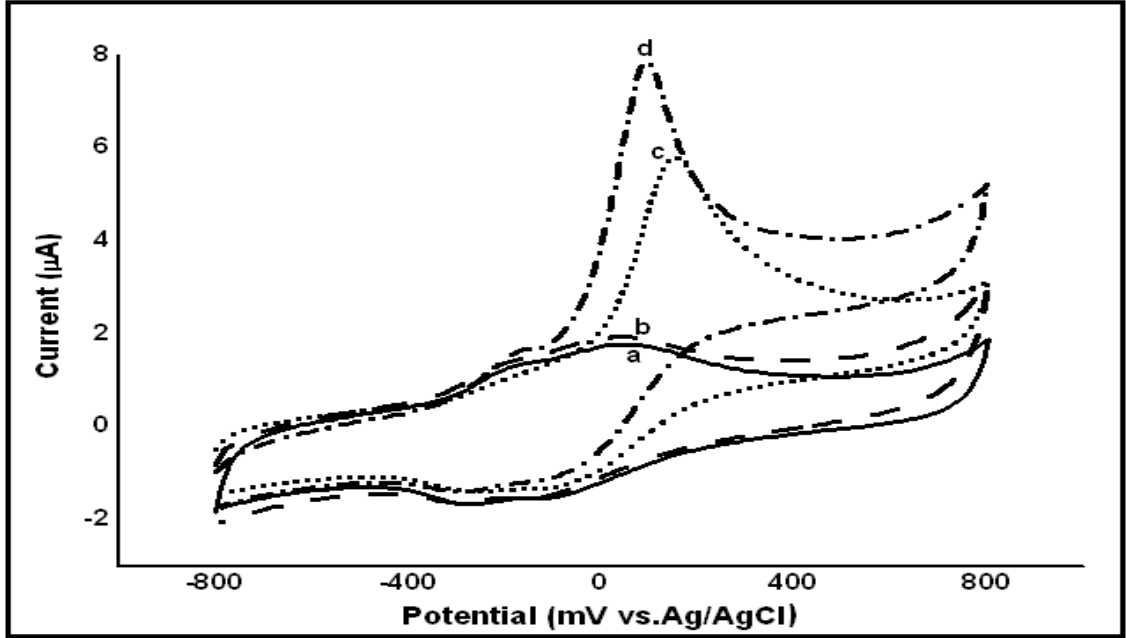
Şekil 28. Poli-AzA/GCE'nin A) 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda ve farklı tarama hızlarındaki (I: 20, 50, 100, 160, 200, 400, 640; II: 800, 1280, 1600, 2560, 3200, 5120, 6400 mV/s) döngüsel voltammogramları, B) pik akımlarının tarama hızı ile değişimi, C) E<sup>0</sup> değerinin pH ile değişimi, D) 50 mV/s tarama hızındaki ardışık 250 döngülü voltammogramları.

#### 4.5.Hazırlanan Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Elektrokatalitik ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi

##### 4.5.1.Döngüsel Voltammetrik Yöntemle

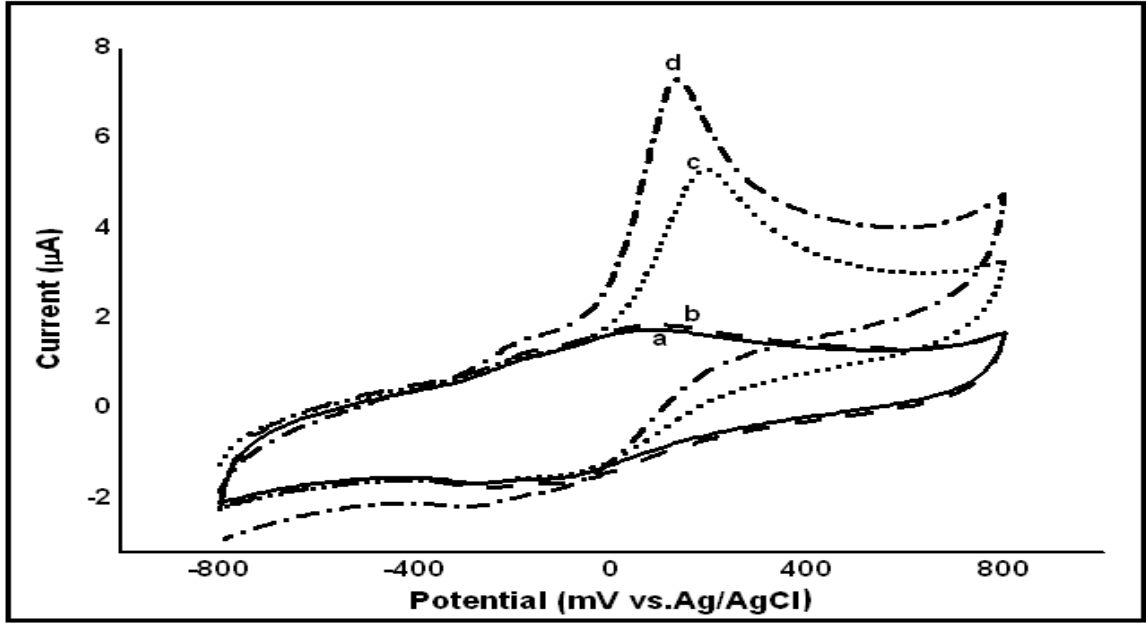
Şekil 29a ve b, sırasıyla Poli-MM/GCE'nin ışıksız ve ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramlarını göstermektedir. Şekilden modifiye elektroda ilişkin monomerik ve polimerik türlerin pik akımlarına ışığın bir etkisinin olmadığı görülmektedir. 0,4 mM NADH'nin Poli-MM/GCE kullanılarak kaydedilen döngüsel voltammogramlarında (Şekil 29c) NADH'nin 160 mV'da yükseltgendiği gözlenmiş ve bu potansiyelin yalın elektroda göre (+510 mV) 350 mV kaydığı gözlenmiştir. Modifiye elektrot yüzeyine ışık düşürüldüğünde ise potansiye 90 mV'a kayarak pik akım yüksekliğinin arttığı (Şekil 29d)

gözlenmiştir. Bu artış Poli-MM/GCE'nin NADH'ye iyi bir fotoelektrokatalitik etki gösterdiğini kanıtlamaktadır.



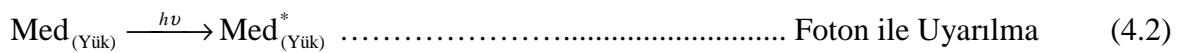
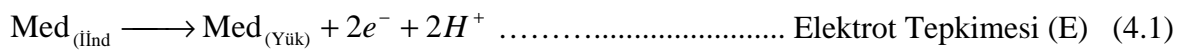
Şekil 29. Poli-MM/GCE'nin a) ışısız ve b) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı; 0,4 mM NADH'nin Poli-MM/GCE kullanılarak c) ışısız ve d) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı. Tarama hızı: 50 mV/s, destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu.

Şekil 30a ve b, sırasıyla Poli-AzA/GCE'nin ışısız ve ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramlarını göstermektedir. Şekilden modifiye elektroda ilişkin monomerik ve polimerik piklerin akımlarına ışığın bir etkisinin olmadığı görülmektedir. 0,4 mM NADH'nin Poli-AzA/GCE kullanılarak kaydedilen döngüsel voltammogramda (Şekil 30c) NADH'nin 190 mV'da yükseltgendiği gözlenmiş ve yalın elektrota göre (+530 mV) 340 mV kadar bir kayma olduğu saptanmıştır. Modifiye elektrot yüzeyine ışık düşürüldüğünde ise potansiyel 140 mV'a kayarak pik akım yüksekliğinin arttığı (Şekil 30d) gözlenmiştir. Bu artış Poli-AzA/GCE'nin NADH'ye iyi bir fotoelektrokatalitik etki gösterdiğini kanıtlamaktadır.

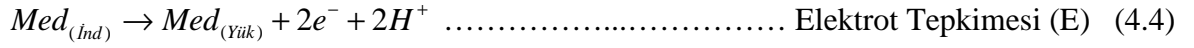
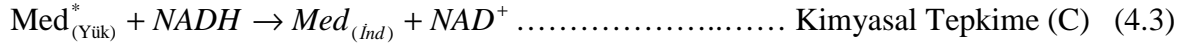


Şekil 30. Poli-AzA/GCE'nin a) ışısız ve b) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı; 0,4 mM NADH'nin Poli-AzA/GCE kullanılarak c) ışısız ve d) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı. Tarama hızı: 50 mV/s, destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu.

NADH'nin bu tür modifiye elektrotlardaki fotoelektrokatalitik yükseltgenme mekanizması, Cooper ve arkadaşlarının toluidin mavisi, metilen mavisi gibi azin türü boyar maddelerle askorbik asidin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi çalışmalarında önerdiği mekanizmaya benzer bir şekilde açıklanabilir (Cooper ve ark., 1998 ve 1999). Önerilen mekanizmaya göre, elektrot yüzeyindeki mediyatör ışık kaynağından gelen ışınla uyarılmış hale geçer, uyarılan mediyatörün yükseltgenmiş formu ile askorbik asit hızlıca tepkimeye girer ve mediyatör indirgenmiş formuna dönüşürken askorbik asit dehidroaskorbik asite dönüşür. Daha sonra mediyatörün indirgenmiş formu elektrot yüzeyinde tekrar yükseltgenirken elektrokatalitik akım oluşur. NADH'nin bu tür modifiye elektrotlarla fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi de buna benzer bir foto-ECE mekanizmasıyla açıklanabilir. Önerilen mekanizma doğrultusunda gerçekleşen tepkimeler aşağıdaki şekilde verilebilir.





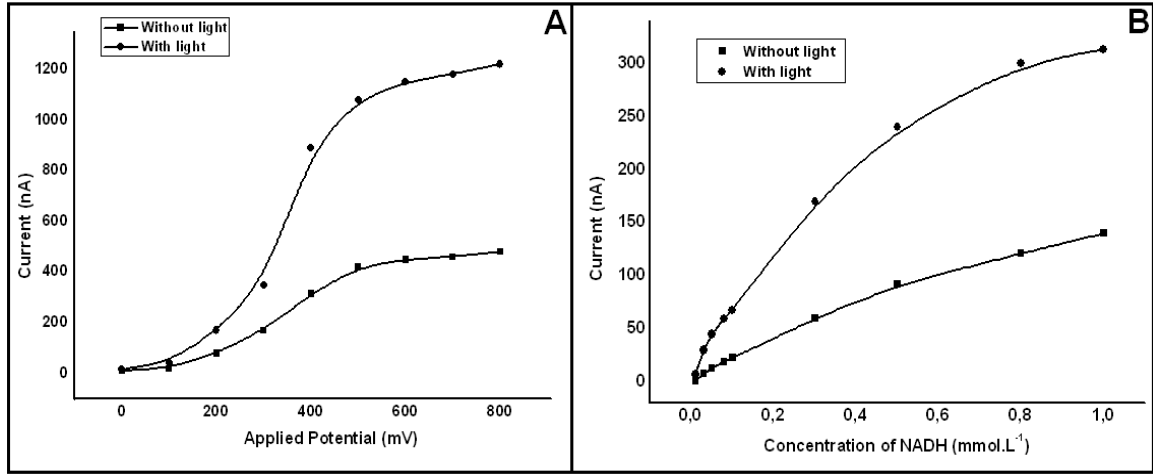


#### **4.5.2. Amperometrik Yöntemle**

Amperometrik çalışmaların gerçekleştirilmesi için öncelikle en uygun uygulama potansiyeli optimize edildi. Bu amaçla 0 mV ile 800 mV arasında değişen sabit potansiyelerde öncelikle yalın GCE kullanılarak 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu destek elektrolit ortamında 0,2 mM NADH için zaman-akım eğrileri ışıklı ve ışıksız ortamda kaydedilmiştir. Aynı şekilde uygun şartlar altında elde edilmiş tüm modifiye elektrotlar kullanılarak -100 mV ile 600 mV arasında değişen sabit potansiyelerde de 0,2 mM NADH için akım-zaman eğrileri ışıklı ve ışıksız ortamda kaydedilmiştir.

Şekil 31A yalın GCE kullanılarak farklı potansiyelerde 0,2 mM NADH için elde edilen amperometrik ve fotoamperometrik akım değerlerine karşılık uygulama potansiyeli grafiğini göstermektedir. Bu şekilde görüldüğü gibi hem ışıksız hem de ışıklı ortamda NADH yaklaşık 400-500 mV'da maksimum akım değerine ulaşmıştır. Işıklı ortamda elde edilen akım değerlerinin ışıksız ortamdan elde edilen akım değerlerinden yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu görülmektedir.

Genelde modifiye elektrotların en uygun uygulama potansiyeli +150 mV olduğundan, yalın GCE'nin de bu potansiyelde NADH derişimine karşı akım değişimi izlenmiş ve Şekil 31B'de verilmiştir. Bu grafiğe göre NADH'nin +150 mV'da yalın GCE'deki akım değerleri oldukça düşük bulunmuş ve ışıkla akım yine artmıştır. Bu olay, NADH'nin de ışıkla uyarılıp elektron transferinin kolaylaştığı şeklinde yorumlanabilir.

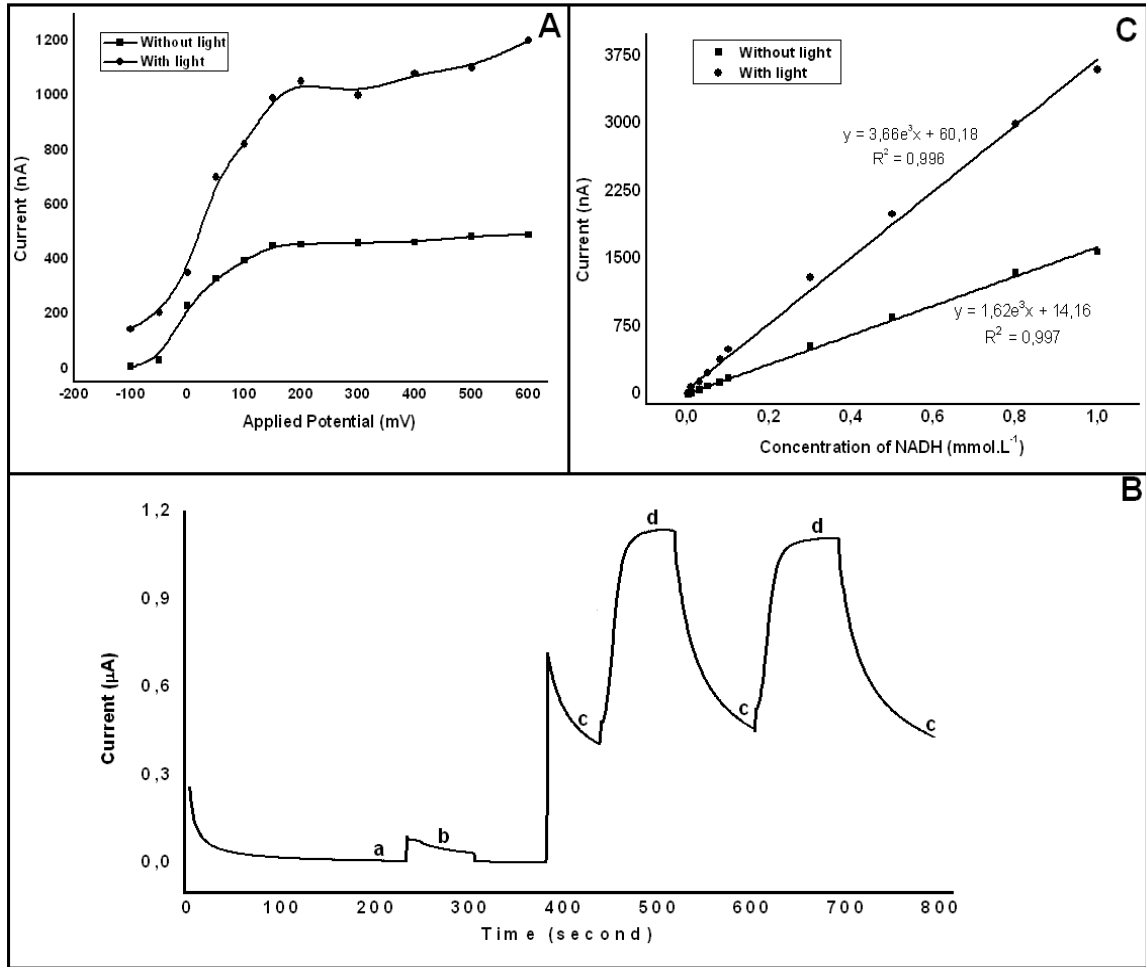


Şekil 31. Yalın elektrotla elde edilen A) uygulama potansiyeli-akım grafiği B) NADH derişimine karşı amperometrik ve fotoamperometrik akım grafiği, uygulama potansiyeli:+150 mV, destek elektrolit:0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu.

Modifiye elektrotlarla NADH'nin amperometrik ve fotoamperometrik yöntemle tayini için tüm modifiye elektrotlar için öncelikle en uygun uygulama potansiyeli optimize edildi. Şekil 32A poli-MM/GCE ile elde edilen akım-uygulama potansiyeli grafiğini göstermektedir. Şekilden görüldüğü gibi, en uygun potansiyelin yaklaşık +150 mV olduğu ve ışıklı ortamda elde edilen akım değerlerinin ışıksız ortamda elde edilenlerden yaklaşık 2-2,5 kat daha büyük olduğu sonucuna varılmıştır. +150 mV'da Poli-MM/GCE kullanılarak 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu ortamındaki akım-zaman grafiği Şekil 32B'de verilmiştir. Zemin akımın (a) sabit bir değere ulaşması için bir süre beklendikten sonra, modifiye elektrodun yüzeyine (a) ışık düşürüldüğünde çok az bir değişimin gözlemlendiği (b), 0,2 mM NADH ilavesiyle akımın arttığı (c) ve ışıkla da NADH'nin akım değerinin yaklaşık 2 kat arttığı (d) ve ışık kapatıldığında fotoakım değerinin d konumundan tekrar c konumuna hızla döndüğü şekilden görülmektedir.

Şekil 32C, Poli-MM/GCE için elde edilen amperometrik ve fotoamperometrik akım değerlerinin derişime karşı değişim grafiğini göstermektedir. Amperometrik yöntemle elde edilen kalibrasyon grafiğinin  $1.0 \times 10^{-6}$  ile  $1.0 \times 10^{-3}$  M NADH aralığında ( $I(\text{nA}) = 1,62 \times 10^3 C (\text{mmol/L}) + 14,16$ ;  $R^2 = 0,997$ ), fotoamperometrik yöntemle elde edilen kalibrasyon grafiğinin ise yine aynı derişim aralığında ( $I(\text{nA}) = 3,66 \times 10^3 C (\text{mmol/L}) + 60,18$ ;  $R^2 = 0,996$ ), doğrusal olduğu bulunmuştur. Grafikten görüldüğü gibi fotoamperometrik yöntemle elde edilen kalibrasyon grafiğinin eğiminin, amperometrik yöntemle elde edilen

grafinin eğiminden yaklaşık 2 kat daha büyük olduğu tespit edilmiştir, başka bir deyişle duyarlılığın arttığı saptanmıştır.

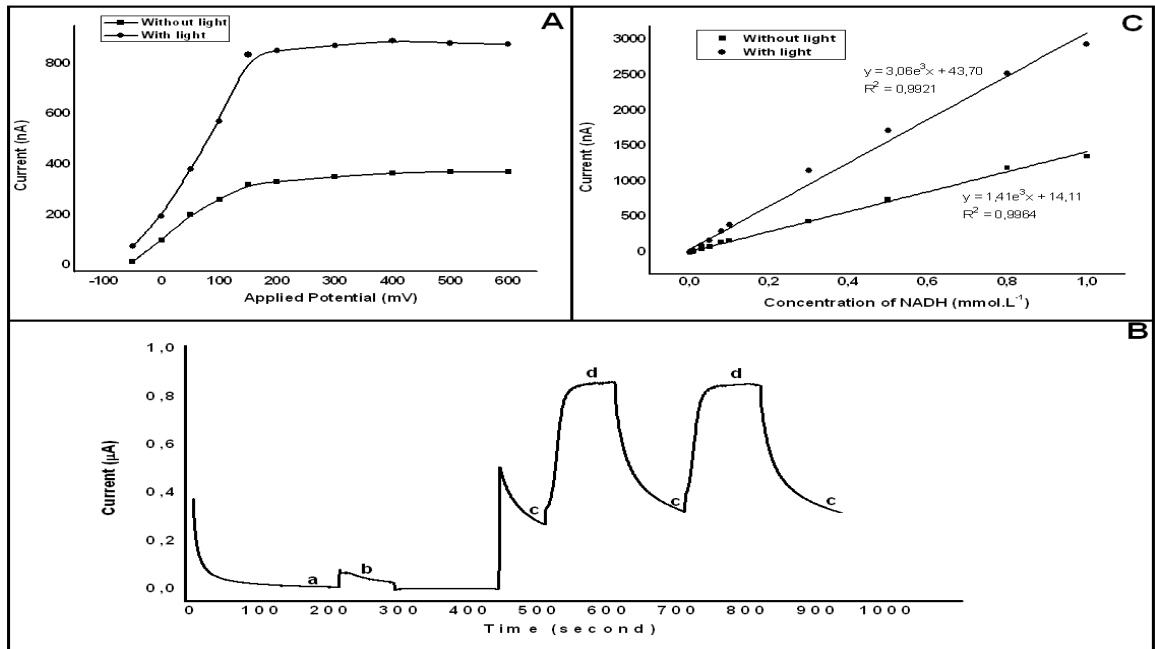


Şekil 32. Poli-MM/GCE ile elde edilen ışıklı ve ışıksız konumlarda **A)** uygulanan sabit potansiyele karşı akımların değişimi, **B)** NADH yokluğunda (a, b) ve 0,2 mM NADH varlığında (c, d) elektrot yüzeyi ışıklandırılmadan (a, c) ve ışıklandırılarak (b, d) elde edilen akım-zaman eğrileri. **C)** NADH derişimine karşı amperometrik ve fotoamperometrik akımların değişimi (B ve C için uygulama potansiyeli: +150 mV, destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu).

Şekil 33A poli-AzA/GCE ile elde edilen akım-uygulama potansiyeli grafiğini göstermektedir. Şekilden görüldüğü gibi, en uygun potansiyelin yaklaşık +150 mV olduğu ve ışıklı ortamda elde edilen akım değerlerinin ışıksız ortamda elde edilenlerden yaklaşık 2 kat daha büyük olduğu sonucuna varılmıştır. +150 mV'da Poli-AzA/GCE kullanılarak 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu ortamındaki akım-zaman grafiği Şekil 33B'de verilmiştir.

Şekil 33C ise Poli-AzA/GCE için elde edilen amperometrik ve fotoamperometrik akım değerlerinin derişime karşı değişim grafiğini göstermektedir. Amperometrik yöntemle elde edilen kalibrasyon grafiğinin  $1.0 \times 10^{-6}$  ile  $1.0 \times 10^{-3}$  M NADH aralığında ( $I(nA) = 1,41 \times 10^3 C (mol/L) + 14,11$ ;  $R^2=0.9964$ ) fotoamperometrik yöntemle elde edilen kalibrasyon grafiğinin ise yine aynı derişim aralığında ( $I(nA) = 3.06 \times 10^3 C (mol/L) + 43,70$ ;  $R^2=0.9921$ ), doğrusal olduğu bulunmuştur.

Ve yine elektrot yüzeylerinin ışıklandırılmasıyla elde edilen kalibrasyon grafiğinin eğiminin, normal amperometrik yolla elde edilen kalibrasyon grafiğinin eğimine oranı yaklaşık 2 çıkmıştır. Bu sonuç modifiye elektrot yüzeyinin ışıklandırılması, duyarlılığa artırıcı bir etki yaptığını göstermektedir.



Şekil 33. Poli-AzA/GCE ile elde edilen ışıklı ve ışıksız konumlarda **A)** uygulanan sabit potansiyele karşı akımların değişimi, **B)** NADH yokluğunda (a, b) ve 0,2 mM NADH varlığında (c, d) elektrot yüzeyi ışıklandırılmadan (a, c) ve ışıklandırılarak (b, d) elde edilen akım-zaman eğrileri. **C)** NADH derişimine karşı amperometrik ve fotoamperometrik akımların değişimi (B ve C için uygulama potansiyeli: +150 mV, destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu).

Poli-MM/GCE ve Poli-AzA/GCE modifiye elektrotları için elde edilen analitik karakteristikler Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. Modifiye elektrotların NADH'ye verdiği amperometrik ve fotoamperometrik yanıtlarından elde edilen kalibrasyon grafiği verileri

<b>Modifiye elektrot</b>	<b>Uygulama Pot. (mV)</b>	<b>Derişim aralığı</b>	<b>Doğru denklemi</b>	<b>m<sub>FA</sub>/m<sub>A</sub></b>
Poli-MM /GCE	+150 mV	1x10 <sup>-3</sup> -1x10 <sup>-6</sup>	I: i(μA) = 1,62x10 <sup>3</sup> C(mM)+14,16 II: i(μA) = 3,66x10 <sup>3</sup> C(mM)+60,18	2,26
Poli-AzA/GCE	+150 mV	1x10 <sup>-3</sup> -1x10 <sup>-6</sup>	I: i(μA) = 1,41x10 <sup>3</sup> C(mM) +14,11 II: i(μA) = 3,06x10 <sup>3</sup> C(mM)+43,70	2,17

**BÖLÜM 5****SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Bu çalışma aşağıda özetlendiği gibi 4 aşamada gerçekleştirilmiştir.

1) Fenotiyazin türü boyar maddeler olan MM ve AzA gibi 2 farklı redoks mediyatörle modifiye GCE hazırlanması: Elektrot yüzeyinin modifikasyonunda daha kararlı olan ve tekrarlanabilir sonuçların elde edildiği elektropolimerizasyon yöntemi seçilmiştir. Her bir redoks mediyatörün elektropolimerizasyonunda destek elektrolit türü veya pH'ı, monomer derişimi, döngü sayısı ve potansiyel aralığı gibi parametreler, modifiye elektrot hazırlandıktan sonra NADH'ye en iyi yanıtın alındığı konum dikkate alınarak, optimize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

2) Hazırlanan her bir modifiye elektrodun karakterizasyonu: Tüm modifiye elektrotların 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu ortamında tarama hızına bağlı olarak döngüsel voltammogramları kaydedilmiş ve tarama hızıyla modifiye elektrotların polimerik türüne ait anodik ve katodik pik akımlarının doğrusal olarak arttığı ve olayın adsorpsiyona bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca tüm modifiye elektrotların farklı pH'larda kaydedilen döngüsel voltammogramlarından elde edilen formal potansiyel değerlerinin pH ile doğrusal azaldığı ve eğimlerin -59 mV'a yakın değerlerde çıktığı sonucuna varılmış ve böylece bu modifiye elektrotların redoks olayında 2 elektron ve  $2H^+$ 'nin katıldığı saptanmıştır. Son olarak her bir modifiye elektrodun 200-300 döngülü voltammogramları kaydedilmiş ve yaklaşık 150-200 döngüden sonra kararlı kaldığı sonucuna varılmıştır.

3) Döngüsel voltammetri yöntemiyle NADH'nin elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi: Her bir modifiye elektrodun 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda döngüsel voltammogramları hem ışıksız hem de ışıklı yöntemde kaydedilmiş, elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla modifiye elektrotlara ait piklerin çok az değiştiği elde edilmiştir. Aynı şekilde bu modifiye elektrotların NADH ortamında döngüsel voltammogramları kaydedilmiş ve yalın elektrotta yaklaşık 500 mV'da yükseltgenen NADH'nin daha negatif potansiyellere kaydığı tespit edilmiş ve elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla da NADH'ye ait elektrokatalitik akımın belirgin bir şekilde arttığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar bu tür modifiye elektrotların NADH'ye iyi bir elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

4-Amperometri yöntemiyle NADH'nin elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik tayini: Bu amaçla her bir modifiye elektrot için optimum uygulama potansiyeli elde edilmiş ve bu potansiyelde ve 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda farklı NADH derişimlerine karşı akım yükseklikleri için akım zaman eğrileri kaydedilmiştir. NADH'nin destek elektrolite ilavesiyle akım artmış, elektrot yüzeyi ışıklandırıldığında ise akımda yaklaşık 2 kat artış gözlenmiştir. Hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için akım değerlerinin  $1 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-3}$  M NADH derişimi aralığında doğrusal değiştii saptanmıştır. Her iki modifiye elektrot için elde edilen analitik karakteristikler Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

Kısaca bu çalışmada, modifiye elektrotlar kullanılarak NADH'nin fotoamperometrik yöntemle daha duyar, hızlı bir şekilde tayin edilebileceği ve bu yöntem kullanılarak NADH'ye bağlı biyosensör geliştirilerek birçok bileşinin daha duyar tayin edilebileceği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Bilgiustam, 2010. <http://www.bilgiustam.com/biyosensor-nedir/>
- Borgo, C. A., Lazarin, A. M. ve Gushikem, Y., 2002. Methylene Blue-Zirconim Phosphate Cellulose Acetate Hybrid Membrane Film Attached to A Platinum Electrode and Its Application in Electrocatalytic Oxidation of NADH. *Sensor and Actuators*, 87: 498-505.
- Cai, C-X. ve Xue, K-H., 1997. Electrocatalysis of NADH Oxidation With Electropolymerized Films of Azure I. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 427: 147-153.
- Cai, C-X. ve Xue, K-H., 1998. Electrochemical Polymerization of Toluidine Blue O and Its Electrocatalytic Activity Toward NADH Oxidation. *Talanta*, 47: 1107-1119.
- Chi, Q. ve Dong, S., 1994. Electrocatalytic Oxidation and Flow Injection Determination of Reduced Nicotinamide Coenzyme at A Glassy Carbon Electrode Modified by A Polymer Thin Film. *Analyst*, 119: 1063-1066.
- Cooper, J. A., Wu, M. ve Compton R. G., 1998. Photoelectrochemical Analysis of Ascorbic Acid. *Anal. Chem.*, 70: 2922-2927.
- Cooper, J. A., Woodhouse, K. E., Chippindale, A. M. ve Compton, R. G., 1999. Photoelectrochemical Determination of Ascorbic Acid Using Methylene Blue Immobilized in Alpha-Zirconium Phosphate. *Electroanalysis*, 11: 1259-1265.
- Cosnier, S. ve Lous, K. L., 1996. A New Strategy for The Construction of Amperometric Dehydrogenase Electrodes Based on Laponite Gel-Methylene Blue Polymer as The Host Matrix. *J. Electroanal. Chem.*, 406: 243-246.



- Dai, Z-H., Liu, F-X., Lu, G-F. ve Bao, J-C., 2008. Electrocatalytic Detection of NADH and Ethanol at Glassy Carbon Electrode Modified with Electropolymerized Films From Methylene Green. *J. Solid State Electrochem.*, 12: 175-180.
- De Lucca, A. R., Santos, A. D., Pereira, A. C. ve Kubota, L. T., 2002. Electrochemical Behavior and Electrocatalytic Study of the Methylene Green Coated on Modified Silica Gel. *J. Colloid Interface Sci.*, 254: 113-119.
- Dilgin, Y., (2004). The Uses of Modified Muscovite at Photoelectrochemical Reactions and the Application to New Techniques. (PhD Thesis) *Ege University, Science Faculty*.
- Gao, Q., Cui, X., Yang, F., Ma, Y. ve Yang, X., 2003. Preparation of Poly(thionine) Modified Screen-Printed Carbon electrode and Its Application to Determine NADH in Flow Injection Analysis System. *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 277-282.
- Gao, Q., Wang, W., Ma, Y. ve Yang, X., 2004. Electrooxidative Polymerization of Phenothiazine Derivatives on Screen-Printed Carbon Electrode and Its Application to Determine NADH in Flow Injection Analysis Aystem. *Talanta*, 62: 477-482.
- Gao, Q., Sun, M., Peng, P., Qi, H. ve Zhang, C., 2010. Electro-oxidative Polymerization of Phenothiazine Dyes into A Multi Layer-Containing Carbon Nanotube on A Glassy Carbon Electrode for The Sensitive and Low-Potential Detection of NADH. *Microchim. Acta*, 168: 299-307.
- Gorton, L. ve Dominguez E., 2002. Encyclopedia of Electrochemistry Edited by Allen J. Bard and Martin Stratmann, Volume 9, Bioelectrochemistry edited by George S. Wilson, Wiley WCH Verlag.
- Gözükara, E., 2001. *Biyokimya*, cilt 2, dördüncü baskı, 680-682.

- IUPAC Recommendations, 1997. Chemically Modified Electrodes: Recommended Terminology and Definitions, *Pure and Applied Chemistry*, 69: 1317-1323.
- Ju, H. X., Dong, L. ve Chen, H. Y., 1996. Amperometric Determination of Lactate Dehydrogenase Based on a Carbon Fiber Microcylinder Electrode Modified Covalently with Toluidine Blue O by Acylation. *Talanta*, 43: 1177-1183.
- Karpinska, J., Starczewska, B. ve Puzanowska-Tarasiewicz, H., 1996. Analytical Properties of 2- and 10-Disubstituted Phenothiazine Derivatives. *Analytical Sciences*, 12: 161- 170.
- Karyakin, A. A., Strakhova, A. K., Karyakina, E. E., Varfolomeyev, A. K. ve Yatsimirsky, A. K., 1993. The Electrochemical Polymerization of Methylene Blue and Bioelectrochemical Activity of the Resulting Film. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 32:35-43.
- <sup>a</sup>Karyakin, A. A., Karyakina, E. E., Schuhmann, W. ve Schmidt H-L., 1999. Electropolymerized Azines: Part II. In a Search of the Best Electrocatalyst of NADH Oxidation. *Electroanalysis*, 11: 553-557.
- <sup>b</sup>Karyakin, A.A., Karyakina, E.E. ve Schmidt, H.L., 1999. Electropolymerized Azines: A new Group of Electroactive Polymers. *Electroanalysis*, 11, 149-155.
- Katakis, I. ve Dominguez, E., 1997. Catalytic Electrooxidation of NADH for Dehydrogenase Amperometric Biosensors. *Microchim. Acta*, 126: 11-32.
- Lawrence, N. S. ve Wang, J., 2006. Chemical Adsorption of Phenothiazine Dyes onto Carbon Nanotubes: Toward The Low Potential Detection of NADH. *Electrochemistry Communications*, 8: 71- 76.
- Li, N. B., Duan, J. P. ve Chen, G. N., 2003. Electrochemical Polymerization of Azure Blue II and Its Electrocatalytic Activity Toward NADH Oxidation. *Chin. J. Chem.*, 523: 93-105.

- Liu, J. ve Mu, S., 1999. The Electrochemical Polymerization of Methylene Blue and Properties of Polymethylene Blue. *Synthetic Met.*, 107: 159-165.
- Lobo, M. J., Miranda, A. J. ve Tunon, P., 1996. A Comparative Study of Some Phenoxazine and Phenothiazine Modified Carbon Paste Electrodes for Ethanol Determination. *Electroanalysis*, 8: 591-596.
- Lobo, M. J., Miranda, A. J. ve Tunon, P., 1997. Amperometric Biosensor Based on NAD(P)-Dependent Dehydrogenase Enzymes. *Electroanalysis*, 9: 191-202.
- Mai, N., Liu, X., Zeng, X., Xing, L., Wei, W. ve Luo, S., 2010. Electrocatalytic Oxidation of The Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide at Carbon Ionic Liquid Electrode Modified With Polythionine/Multi-Walled Carbon Nanotubes Composite. *Microchim. Acta*, 168: 215-220.
- Meng, L., Wu, P., Chen, G., Cai, C., Sun, Y. ve Yuan Z., 2009. Low Potential Detection of Glutamate Based On The Electrocatalytic Oxidation of NADH at Thionine/Single Walled Carbon Nanotubes Composite Modified Electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 1751- 1756.
- Munteanu, F. D., Okamoto, Y. ve Gorton, L., 2003. Electrochemical and Catalytic Investigation of Carbon Paste Modified With Toluidine Blue O Covalently Immobilised on Silica Gel. *Anal. Chim. Acta*, 476: 43-54.
- Murray, R. W., Ewing, A. G. ve Durst, R. A., 1987. Chemically Modified Electrodes, Molecular design for Electroanalysis. *Anal. Chem.*, 59:379-390.
- Nauratilova, Z. ve Kula, P., 2003. Clay Modified Electrodes: Present Applications and Prospects. *Electroanalysis*, 15: 837-846.

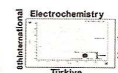
- Nişli, G., 2001. Kimyasal Modifiye Elektrotlar Eser Analiz Yaz Okulu, Ed: Henden, E., Gökçel, H. İ., Ertaş, N., Bornova-İzmir. 199-211.
- Nişli, G., Gökçel, H. İ. ve Dursun, Z., 2002. Akışkan Sisteme Enjeksiyon (FIA) Tekniği İle Voltammetrik Analizler, Kimyasal Eser Analiz Yaz Okulu, Ed: Henden, E., Gökçel, H. İ., Ertaş, N., Bornova-İzmir. 175-195.
- Pessoa, C. A., Gushikem, Y., Kubota, L. T. ve Gorton, L., 1997. Preliminary Electrochemical Study of Phenothiazines and Phenoxazines Immobilized on Zirconium Phosphate. *J. Electroanal. Chem.*, 431: 23-27.
- Qi, B., Peng, X., Fang, J. ve Guo, L., 2009. Ordered Mesoporous Carbon Functionalized with Polythionine for Electrocatalytic Application. *Electroanalysis*, 21: 875-880.
- Sha, Y., Gao, Q., Qi, B. ve Yang, X., 2004. Electropolymerization of Azur B on A Screen-Printed Carbon Electrode and its Application to the Determination of NADH in a Flow Injection Analysis System. *Microchimica Acta*, 148: 335-341.
- Silber, A., Hampp, N. ve Schuhmann, W., 1996. Poly(methylene blue)-Modified Thick Film Gold Electrodes for The Electrocatalytic Oxidation of NADH and Their Application in Glucose Biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 11: 215-223.
- Silberg, I. A., Cormos, G., Oniciu, D.C. ve Katritzky, A., 2006. Retrosynthetic Approach to Synthesis of Phenothiazines. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 90: 205-233.
- Simon, E. ve Bartlett P. N., 2003. Biomolecular Films, Design, Function and Applications. In: Rusling J.F., Ed: Marcel Dekker, New York.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., West D. M. ve Crouch S.R., 2004. Fundamentals of Analytical Chemistry. *Bilim Yayınları*, 8:694-697.

- Smyth, M. R. ve Vos, J. G., 1992. Analytical Voltammetry, Comprehensive Analytical Chemistry. Volume XXVII. Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo, 93-96 and 465-530.
- Tse, D. C.-S. ve Kuwana, T., 1978. Electrocatalysis of Dihyronicotinamid Adenosine Diphosphate With Quinones and Modified Quinone Electrode. *Anal. Chem.*, 50: 1315-1318.
- Tural H., Gökçel H. I. ve Ertaş N., 2006. Enstrumental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler. *Ege Uni. Fen Fakültesi Yayınları*, Bornova-İzmir. 1 (2): 131-196.
- Villamil, M. J. F., Ordieres, A. J. M. ve Blanco, P. T., 1997. Immobilized Enzyme Electrode for The Determination of L-lactate in Food Samples. *Anal. Chim. Acta*, 345: 37-43.
- <sup>a</sup>Wang, G. L., Xu J. J. ve Chen H. Y., 2009. Progress in the Studies on Photoelectrochemical Sensors. *Sci. China Ser. B-Chem.*, 52: 1789-1800.
- <sup>b</sup>Wang, G. L., Xu J. J. ve Chen H. Y., 2009. Dopamine Sensitized Nanoporous TiO<sub>2</sub> Film on Electrodes: Photoelectrochemical Sensing of NADH Under Visible Irradiation. *Biosens. Bioelectron.*, 24: 2494-2498.
- Walcarius, A., 1998. Analytical Applications of Silica-Modified Electrodes- A Comprehensiv Review. *Electroanalysis*, 10: 1217-1235.
- Walcarius A., 1999. Zeolite-Modified Electrodes in Electroanalytical Chemistry. *Anal. Chim. Acta.*, 384: 1-16.
- Wikipedia, 2010. [http://en.wikipedia.org/wiki/Nicotinamide\\_adenine\\_dinucleotide](http://en.wikipedia.org/wiki/Nicotinamide_adenine_dinucleotide)

- Zaitseva, G., Gushikem, Y., Ribeiro, E. S. ve Rosatto, S. S., 2002. Electrochemical Property of Methylene Blue Redox Dye Immobilized on Porous Silica-Zirconia-Antimonia Mixed Oxide. *Electrochim. Acta*, 47: 1469-1474.
- Zen, J. M., Kumar, A. S. ve Tsai, D. M., 2003. Recent Updates of Chemically Modified Electrodes in Analytical Chemistry. *Electroanalysis*, 15: 1073-1087.
- Zeng, J., Wei, W., Wu, L., Liu, X., Liu, K. ve Li, Y., 2006. Fabrication of Polytoluidine Blue O)/Carbon Nanotube Composite Nanowires and Its Stable Low-Potential Detection of NADH. *J. Electroanal. Chem.*, 595: 152-160.
- Zhou, D-M., Fang H-Q., Chen H-Y., Ju H-X. ve Wang Y., 1996. The Electrochemical Polymerization of Methylene Gren and Its Electrocatalysis for The Oxidation of NADH. *Analytica Acta*, 329: 41-48.
- Zhou, D-M., Sun, J-J., Chen, H-Y. ve Fang, H-Q., 2008. Electrochemical Polymerization of Toluidine Blue and Its Application for The Amperometric Determination of  $\beta$ -D-Glucose, *Electrochim. Acta*, 43: 1803-1809.

## **EKLER LİSTESİ**

EK 1. 8 <sup>th</sup> International Electrochemistry Meeting October 8-11, 2009.....	II
--	----



## Photoelectrocatalytic oxidation of NADH using a poly-methylene blue modified glassy carbon electrode

Burcu BAYRAK<sup>1</sup>, Bensu ERTEK<sup>1</sup>, Didem Giray DİLGİN<sup>2</sup>, H. İsmet GÖKÇEL<sup>2</sup>, Bayram KIZILKAYA<sup>3</sup>, Yusuf DİLGİN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Art and Science, Dept. of Chemistry, Çanakkale, Turkey

<sup>2</sup>Ege University, Faculty of Science, Dept. of Chemistry, Bornova, İzmir, Turkey

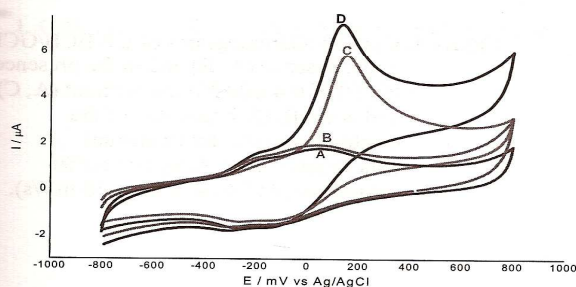
<sup>3</sup>Çanakkale Onsekiz Mart University, the Centre for Research on Science&Technology, Çanakkale, Turkey

burcu\_bayrak\_@hotmail.com

Recently, many researchers have been focused on the electrocatalytic oxidation of NADH (Reduced  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide) due to its vital importance in the living system (1). Although, the electrocatalytic oxidation of NADH was studied using Methylene Blue (MB) modified electrodes (2,3), the photoelectrocatalysis of NADH with this type modified electrodes have not been investigated.

In this study, photoelectrocatalytic oxidation of NADH has been described using poly-methylene blue modified glassy carbon electrode (P-MB/GCE). The effect of supporting electrolyte with different pH, monomer concentration, cycle numbers and potential window (especially upper potential) during the electropolymerization process of MB on the electrocatalytic oxidation of NADH was investigated using cyclic voltammetric technique. The optimum conditions for electropolymerization process were determined as the phosphate buffer with pH 5.0 containing 0.1 M  $\text{NaNO}_3$  for supporting electrolyte, 0.05 mM MB for monomer concentration, range from -0.7 to +1.2 V (vs. Ag/AgCl) for potential window and 10 cycles for cycle numbers. After preparation of modified electrode in the optimum conditions, the effect of scan rate and pH on the electrochemical behavior of P-MB/GCE was investigated.

Figure 1A shows the cyclic voltammogram of P-MB/GCE in the phosphate buffer solution at pH 7.0. Two pairs of well defined redox peaks were observed in this voltammogram. As can be seen from Figure 1B, the current and potential of peaks were not changed, when the electrode surface was irradiated with 250 watt halogen lamp. In the oxidation of NADH at the bare GCE, the irreversible anodic peak was observed at about 510 mV. When the cyclic voltammogram of P-MB/GCE was recorded in the presence of NADH, the anodic peak potential of NADH shifted to 160 mV (Figure 1C). As a result, P-MB/GCE shows electrocatalytic activity toward NADH oxidation with an overpotential of ca. 350 mV lower than that at the bare electrode. The photoelectrocatalytic oxidation of NADH at this electrode was also successfully investigated by using cyclic voltammetry and amperometry at constant potential. When the modified electrode surface was irradiated with a 250W halogen lamp, a photoelectrocatalytic effect was observed for NADH oxidation and the current was increased about 1.5 times (Figure 1D).



**Figure 1.** Cyclic voltammograms of a P-MB/GCE in the absence (A, B) and in the presence (C, D) of 0.4 mM NADH without (A, C) and with (B, D) irradiation of the electrode surface. Experimental Conditions: 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.0; scan rate: 50 mV/s).

### References

1. L. Gorton, E. Dominguez, Encyclopedia of Electrochemistry edited by Allen J. Bard and Martin Stratmann, Volume 9, Bioelectrochemistry edited by George S. Wilson, 2002, Wiley WCH Verlag.
2. Q. Chi, S. Dong, Analyst, 119 (1994) 1063-1066
3. A. Silber, N. Hampf, W. Schuhmann, Biosensor&Bioelectronics, 11 (1996) 215-223.



## ÇİZELGELER LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 1.1. Voltammetrik tekniklerin sınıflandırılması (Tural ve ark., 2006).....	4
Çizelge 1.2. Elektrot modifikasyon yöntemleri (Murray ve ark., 1987).....	10
Çizelge 2.1. NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine dayalı yapılan bazı çalışmalarda kullanılan fenotiyazin grubu redoks medyatörleri.....	30
Çizelge 2.2. Bazı biyosensör çalışmalarında kullanılan fenotiyozin grubu redoks mediyatörler.....	34
Çizelge 4.1. Modifiye elektrotların hazırlanması için elde edilen optimum değerler .....	53
Çizelge 4.2. Modifiye elektrotların NADH'ye verdiği amperometrik ve fotoamperometrik yanıtlarından elde edilen kalibrasyon grafiği verileri.....	63

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Fenotiyazinin molekül yapısı.....	1
Şekil 2. Fenotiyazın eldesi.....	1
Şekil 3. Fenotiyazın türü bazı boyar maddeler .....	2
Şekil 4. Voltammetride kullanılan çalışma elektrotları.....	8
Şekil 5. Farklı yollarla hazırlanan KME'lerin şematik gösterimi.....	11
Şekil 6. NAD <sup>+</sup> ve NADP <sup>+</sup> nın yapısı.....	15
Şekil 7. NAD <sup>+</sup> nın redoks tepkimesi.....	16
Şekil 8. NAD <sup>+</sup> ve NADH'nin UV absorpsiyon spektrumu.....	16
Şekil 9. Malik asitin enzimatik tepkimesi.....	18
Şekil 10. Bir redoks mediyatörle NADH'nin yükseltgenme mekanizması.....	21
Şekil 11. Redoks mediyatörle modifiye edilmiş elektrotlarda NADH'nin yükseltgenme mekanizması.....	22
Şekil 12. pH 7,4 fosfat tamponunda, 50mV/s tarama hızında A:TM-KNT, B:TM-PGE, C:TM-GT, D:Yalın KNT modifiye elektrotlarının 5mM NADH yokluğunda ve varlığındaki döngüsel voltametrik yanıtları gözlenmiştir.....	24
Şekil 13. Şekil 18'deki aynı deney şartları altında 5mM NADH yokluğunda ve varlığındaki A:AC-KNT, B: AC-PGE, C:AC-GT, D: Yalın KNT modifiye elektrotlarının döngüsel voltammetrik yanıtları.....	25
Şekil 14. A:TM-KNT/PGE, B:TM-GT/PGE ve C: KNT/PGE çalışma elektrotlarına ardışık 50µM NADH ilavesinde oluşan akım-zaman kayıtları.....	26
Şekil 15. 50 mV/s tarama hızında 0,2mM Azur A içeren pH:6,9 fosfat tamponunda Azur A'nın elektropolimerizasyon prosesi boyunca döngüsel voltamogramları (başlangıç potansiyeli 0,4V Ag/AgCl) Ekte 50mV/s tarama hızında 0,2M pH 6,9 fosfat tamponunda poli(azurA) modifiye elektrodunun döngüsel voltammogramlarını gösterir.....	27
Şekil 16. AzA'nin elektropolimerizasyon mekanizması.....	27

Şekil 17. 5 mV/s atarama hızında, 0,1 mM NADH varlığında (b ve c) ve yokluğundaki poli(azur A) modifiye screen-printed karbon elektrodun (a ve b) ve yalın screen printed karbon elektrodun ( c )döngüsel voltammogramları.....	28
Şekil 18. Poli-Azur A modifiye screen-printed karbon elektrotta NADH enjeksiyonu ile akışa enjeksiyon yanıtları.NADH çözeltisinin konsantrasyonu $5 \times 10^{-7}$ 'den $1 \times 10^{-4}$ M'a artmıştır. Akış hızı:75mL/dk, uygulama potansiyeli 0,2 V'dur. Elektrolit ve taşıyıcı pH 6,9 fosfat tamponudur.....	29
Şekil 19. Redoks mediyatörle modifiye elektrot kullanılarak NADH'ye bağlı geliştirilen etanol biyosensörünün şematik gösterimi.....	33
Şekil 20. 0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren A) 0,1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> C) pH 5,0 ve E) pH 10,0 olan fosfat çözeltisi destek elektrolitlerinde 0,05 mM MM'nin, ardışık olarak alınan döngüsel voltammogramları (tarama hızı: 100 mV/s). B, D ve F) Sırasıyla A, C ve E'den elde edilen poli-MM/GCE'nin (a) NADH yokluğunda ve (b) 0,4 mM NADH varlığındaki, (c) yalın GCE'nin 0,4 mM NADH varlığındaki döngüsel voltammogramları (destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu; tarama hızı: 50 mV/s).....	45
Şekil 21. Poli-MM/GCE'nin hazırlanması esnasındaki A) destek elektrolitin, B) anodik potansiyel sınırının, C) monomer derişiminin ve D) döngü sayısının, 0,4 mM NADH'nin elektrokatalitik pik akımına etkisi.....	46
Şekil 22. 0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren pH 5,0 fosfat çözeltisi destek elektrolitinde A) (-0,7) – (+0,6) V C) (-0,7) – (+1,6) V potansiyel aralığında 0,05 mM MM'nin, ardışık olarak alınan döngüsel voltammogramları (tarama hızı: 100 mV/s). B ve D) Sırasıyla A ve C'den elde edilen poli-MM/GCE'nin (a) NADH yokluğunda ve (b) 0,4 mM NADH varlığındaki, (c) yalın GCE'nin 0,4 mM NADH varlığındaki döngüsel voltammogramları (destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu; tarama hızı: 50 mV/s).....	48
Şekil 23. MM'nin elektropolimerizasyon mekanizması.....	49

Şekil 24. 0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren A) 0,1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> C) pH 5,0 ve E) pH 10,0 olan fosfat çözeltisi destek elektrolitlerinde 0,03 mM AzA'nın, ardışık olarak alınan döngüsel voltammogramları (tarama hızı: 100 mV/s). B, D ve F) Sırasıyla A, C ve E'den elde edilen poli-AzA/GCE'nin (a) NADH yokluğunda ve (b) 0,4 mM NADH varlığındaki, (c) yalın GCE'nin 0,4 mM NADH varlığındaki döngüsel voltammogramları (destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu; tarama hızı: 50 mV/s).....	51
Şekil 25. Poli-AzA/GCE'nin hazırlanması esnasındaki A) destek elektrolitin, B) anodik potansiyel sınırının, C) monomer derişiminin ve D) döngü sayısının 0,4 mM NADH'nin elektrokatalitik pik akımına etkisi.....	52
Şekil 26. 0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren pH 5,0 fosfat çözeltisi destek elektrolitinde A) (-0,7) – (+0,6) V C) (-0,7) – (+1,6) V potansiyel aralığında 0,03 mM AzA'nın, ardışık olarak alınan döngüsel voltammogramları (tarama hızı: 100 mV/s). B ve D) Sırasıyla A ve C'den elde edilen poli-AzA/GCE'nin (a) NADH yokluğunda ve (b) 0,4 mM NADH varlığındaki, (c) yalın GCE'nin 0,4 mM NADH varlığındaki döngüsel voltammogramları (destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu; tarama hızı: 50 mV/s).....	53
Şekil 27. Poli-MM/GCE'nin A) 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda ve farklı tarama hızlarındaki (I: 20, 50, 100, 160, 200, 400, 640; II: 800, 1280, 1600, 2560, 3200, 5120, 6400 mV/s) döngüsel voltammogramları, B) pik akımlarının tarama hızı ile değişimi, C) E <sup>0</sup> değerinin pH ile değişimi, D) 50 mV/s tarama hızındaki ardışık 300 döngülü voltammogramları.....	55
Şekil 28. Poli-AzA/GCE'nin A) 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda ve farklı tarama hızlarındaki (I: 20, 50, 100, 160, 200, 400, 640; II: 800, 1280, 1600, 2560, 3200, 5120, 6400 mV/s) döngüsel voltammogramları, B) pik akımlarının tarama hızı ile değişimi, C) E <sup>0</sup> değerinin pH ile değişimi, D) 50 mV/s tarama hızındaki ardışık 250 döngülü voltammogramları.....	56

Şekil 29. Poli-MM/GCE'nin a) ışısız ve b) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı; 0,4 mM NADH'nin Poli-MM/GCE kullanılarak c) ışısız ve d) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı. Tarama hızı: 50 mV/s, destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu.....	57
Şekil 30. Poli-AzA/GCE'nin a) ışısız ve b) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı; 0,4 mM NADH'nin Poli-AzA/GCE kullanılarak c) ışısız ve d) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı. Tarama hızı: 50 mV/s, destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu.....	58
Şekil 31. Yalın elektrotla elde edilen A) uygulama potansiyeli-akım grafiği B) NADH derişimine karşı amperometrik ve fotoamperometrik akım grafiği, uygulama potansiyeli:+150 mV, destek elektrolit:0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu.....	60
Şekil 32. Poli-MM/GCE ile elde edilen ışıklı ve ışısız konumlarda A) uygulanan sabit potansiyele karşı akımların değişimi, B) NADH yokluğunda (a, b) ve 0,2 mM NADH varlığında (c, d) elektrot yüzeyi ışıklandırılmadan (a, c) ve ışıklandırılarak (b, d) elde edilen akım-zaman eğrileri. C) NADH derişimine karşı amperometrik ve fotoamperometrik akımların değişimi (B ve C için uygulama potansiyeli: +150 mV, destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu).....	61
Şekil 33. Poli-AzA/GCE ile elde edilen ışıklı ve ışısız konumlarda A) uygulanan sabit potansiyele karşı akımların değişimi, B) NADH yokluğunda (a, b) ve 0,2 mM NADH varlığında (c, d) elektrot yüzeyi ışıklandırılmadan (a, c) ve ışıklandırılarak (b, d) elde edilen akım-zaman eğrileri. C) NADH derişimine karşı amperometrik ve fotoamperometrik akımların değişimi (B ve C için uygulama potansiyeli: +150 mV, destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu).....	62

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Burcu BAYRAK  
Doğum Yeri : Keşan  
Doğum Tarihi : 09.09.1984

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Ege Üniversitesi  
Fen Fakültesi, Kimya Bölümü  
2003-2008  
Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı  
2008 - 2010  
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar - SCI – Diğer

b) Bildiriler – Uluslararası – Ulusal

1- Dilgin, D.G., Ertek, B., Dönmez, E., **Bayrak, B.**, Gökçel, H.İ., Dursun, Z., Dilgin, Y.,  
“Metilen Yeşili-Modifiye Camımsı Karbon Elektrot Kullanılarak NADH'nin Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi” 1. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, 7-10 Nisan 2010, BURSA (Poster)

2- **Bayrak, B.**, Ertek, B., Dilgin, G. D., Gökçel, H. İ., Kızılkaya, B., Dilgin, Y.,  
“Photoelectrocatalytic Oxidation of NADH Using a Methylene Blue Modified Glassy Carbon Electrode” 8th International Electrochemistry Meeting, 8-11 October 2009, ANTALYA (Poster).

3- **Bayrak, B.**, Ertek, B., Dilgin, D. G., Gökçel, H. İ., Dursun, Z., Kızılkaya, B., Dilgin, Y.,  
“Photoelectrocatalytic Oxidation of NADH Using a Brilliant Cresyl Blue Modified Glassy Carbon Electrode” 8th International Electrochemistry Meeting, 8-11 October 2009, ANTALYA (Poster).

c) Katıldığı Projeler:

1- 107 T 572 nolu TUBİTAK Projesi Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Elektrokatalitik ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi, 2010-ÇANAKKALE.

2- 2009/15 nolu ÇOMÜ BAP Projesi.

## **İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

## **İLETİŐİM**

E-posta Adresi : burcu\_bayrak\_@hotmail.com