

KANAMISİN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ SENSÖR HAZIRLANMASI VE
UYGULAMASI

Deniz IŞIK

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ
Ortak Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Samet ŞAHİN

Mart – 2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

Deniz IŞIK tarafından hazırlanan “KANAMİSİN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ SENSÖR HAZIRLANMASI ve UYGULAMASI” adlı tez çalışması, aşağıda belirtilen jüri tarafından Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek OY BİRLİĞİ ile Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

19/03/2020

Prof. Dr. Önder UYSAL
Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Cengiz YENİKAYA
Anabilim Dalı Başkanı, Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ
Danışman, Kimya Anabilim Dalı

Dr. Öğr. Üyesi Samet ŞAHİN
Ortak Danışman, Biyomühendislik Bölümü, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi

Sınav Komitesi Üyeleri

Prof. Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ
Kimya Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN
Biyomühendislik Bölümü, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÜLEŞEN
Makina Mühendisliği Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

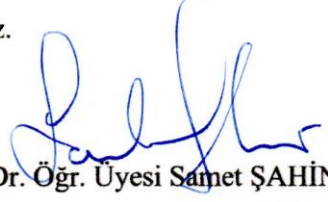


ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Kütahya Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının %16 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.



Prof. Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ



Dr. Öğr. Üyesi Samet ŞAHİN



Deniz IŞIK



KANAMİSİN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ SENSÖR HAZIRLANMASI VE UYGULAMASI

Deniz IŞIK

Kimya, Yüksek Lisans Tezi, 2020

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ

Ortak Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Samet ŞAHİN

ÖZET

Bu tez çalışmasında kanamisin (KAN) tayini için moleküler baskılanmış polimer elektrot üzerinde elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniği kullanılarak yeni bir yöntem geliştirilmiştir. İlk olarak, camı karbon elektrot grafen oksitle kaplandıktan sonra KAN içeren pirol çözeltisiyle modifiye edilerek polimerleştirilmiştir. Daha sonra ise, KAN molekülleri, KAN baskılanmış polimer yüzeyden asit yardımıyla sökülerek KAN'a özgü moleküler izler elde edilmiştir. Hazırlanan elektrotlar ve elektrot malzemeleri; taramalı elektron mikroskopi (SEM), X-Işınları fotoelektron spektroskopisi (XPS), dönüşümlü voltametri (CV), ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) teknikleriyle karakterize edilmiştir.

KAN baskılı elektrotun hazırlanma aşaması farklı parametreler için optimize edilmiştir. Geliştirilen elektrotlar üzerine inkübe edilen farklı KAN konsantrasyonlarına karşılık kullanılan redoks probun yük aktarım dirençleri belirlenerek kalibrasyon çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmanın doğrusal tayin aralığı 5 nM-1000 nM ve belirlenen kalibrasyon eşitliği de $R_{ct}=0,21118+0,00057[KAN]$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, geliştirilen yöntemin alt tayin sınırı (LOD) 5 nM olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemin doğruluk ve kesinlik değerleri, gün içi ve ardışık beş gün için günler-arası olmak üzere %4'ün altında değer verdiği için doğruluğu ve kesinliği yüksek bulunmuştur. Kanamisin ile girişim yapması muhtemel tobramisin (TOB), gentamisin (GEN), penisilin (PEN) ve amoksilin ile birlikte 1 mM Na⁺, 1 mM NH₄⁺ gruplarının girişim etkileri incelenmiştir. KAN tayin yönteminin gerçek numune performansını belirlemek için çeşme suyu ve süt numuneleri kullanılmış ve bu numunelerde KAN tayin uygulaması başarıyla yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanamisin tayini, Elektrokimyasal impedans spektroskopisi, Moleküler baskılanmış polimer elektrot.

PREPARATION AND APPLICATION OF MOLECULARLY IMPRINTED SENSOR FOR KANAMYCIN DETECTION

Deniz IŞIK

Chemistry, M.S. Thesis, 2020

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ

Thesis Co-Advisor: Assist. Prof. Dr. Samet ŞAHİN

SUMMARY

In this study, a new method has been developed on the molecularly imprinted polymer electrode for the determination of kanamycin (KAN) using electrochemical impedance spectroscopy technique. First, a glassy carbon electrode was coated with graphene oxide and a pyrrole solution containing KAN was polymerized. Later, KAN molecules were removed from the KAN suppressed polymer surface using acid and molecular traces specific to KAN were obtained. Prepared electrodes and electrode materials were characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-Rays photoelectron spectroscopy (XPS), alternating voltammetry (CV), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques.

The preparation steps of the KAN printed electrode have been optimized for different parameters. A calibration study was carried out determining the charge transfer resistances of the redox probe used against different KAN concentrations incubated on the developed electrodes. The linear detection range of the study was 5 nM-1000 nM and the calibration equation were calculated as $R_{ct} = 0,21118 + 0,00057 [KAN]$. Besides, the limit of detection of the developed method (LOD) was found as 5 nM.

The accuracy and precision of the developed method were found to be high and accurate because the obtained values were less than 4%, between intraday and between days for five consecutive days. The interference effects of 1 mM Na⁺, 1 mM NH₄⁺ groups together with tobramycin, gentamicin, penicillin, and amoxicillin, which are likely to interfere with kanamycin, were examined. Tap water and milk samples were used to determine the real sample performance of the KAN determination method which was successfully performed in these samples.

Keywords: Kanamycin analysis, Electrochemical Impedance Spectroscopy, Molecularly imprinted polymer electrode.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca beni her zaman destekleyen ve yücelten, büyük bir sabırla tüm bildiklerini bana da aktarmaya çalışan, bütün laboratuvar imkanlarını sunan, her gün yeni bilgiler öğreten, ufkumu ve bakış açımı değiştiren danışmanım sayın Prof. Dr. Zafer Üstündağ' a ve katkılarından dolayı ortak danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Samet Şahin'e teşekkür ederim. Ayrıca bütün çalışmalarım sırasında manevi desteğini asla esirgemeyen Gamze Çelik'e teşekkür ederim. Bugüne kadar eğitimimde payı olan tüm hocalarıma ayrıca teşekkür ederim.

Her başarımın ardından beni onurlandıran, desteğine asla esirgemeyen babam, Mesut Işık'a, annem Nurcan Işık ve kız kardeşlerim Gözde Ecrin Işık ve Filiz Okatan'a, tüm dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	15
2. TEORİK TEMELLER	17
2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi	17
2.2. Kanamisin ve Özellikleri.....	18
2.3. Kanamisin Tayini	20
2.4. Grafen Oksitin (GO) Elektrot Olarak Kullanılmasının Önemi	22
3. DENEYSEL KISIM.....	23
3.1. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler.....	23
3.2. Grafen Oksitin (GO) Hazırlanması ve GC Yüzeyine Modifikasyonu	23
3.3. KAN Molekülü Baskılanmış Polipirol Modifiye GC/GO Yüzeyin Hazırlanması	24
3.4. Hazırlanan Malzemelerin ve Elektrotların Karakterizasyonu	25
3.5. Modifiye Elektrot Üzerinde KAN Tayini için Yöntemi Geliştirilmesi	25
3.6. Gerçek Numune Analizi.....	26
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Moleküller Baskılanmış Elektrotların Karakterizasyon Sonuçları.....	27
4.2. Modifiye Elektrot Üzerinde KAN molekülü İçin Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Sonuçların Değerlendirilmesi	35
4.2.1. GC yüzeyine GO süspansiyonunun damlatılma hacminin belirlenmesi	35
4.2.2. 50 mM pirol içine karıştırılarak moleküler baskılanacak KAN konsantrasyonunun belirlenmesi.....	36
4.2.3. 25 mM KAN katkılanmış polipirol modifiye elektrotlardan 2 M HCl içinde KAN'ın sökülerek çıkarılması için gereken ideal sürenin belirlenmesi	38
4.2.4. GC/GO-pPy-KAN* yüzeyine 1 µM KAN standardının ideal inkübasyon süresinin belirlenmesi	39

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.3. Moleküler Baskılanmış Elektrotla KAN Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Sonuçların değerlendirilmesi.....	40
5. SONUÇ	45
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	46
ÖZGEÇMİŞ	



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bazı kanamisin türevleri	19
3.1. GC/GO-pPy-KAN* yüzeyinin oluşturulması şeması	25
4.1. 25 mM KAN içeren 50 mM pirolün pH=7 PBS tamponunda (0,1 M KCl destek elektrolit içinde, Ag/AgCl referans elektrota karşı) beş çevrimlik dönüşümlü voltamogramları (tarama hızı: 50 mV/s)	27
4.2. GO ve grafitin Raman Spektrumları	28
4.3. GO'nun SEM görüntüsü	29
4.4. Hazırlanan elektrotların (GC/GO-pPy, GC/GO-pPy-KAN ve GC/GO-pPy-KAN*) AFM görüntüleri.....	30
4.5. GC/GO-pPy-KAN için XPS spektrumu.....	31
4.6. GC/GO-pPy, GC/GO-pPy-KAN ve GC/GO-pPy-KAN* yüzeylerinin N _{1s} O _{1s} dar bölge XPS spektrumları	31
4.7. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ redoks probun (0,1 M KCl içinde) GC, GO/GC, GC/GO-pPy ve GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki dönüşümlü voltamogramları (tarama hızı: 200 mV/s; referans elektrot: Ag/AgCl _(doy))	32
4.8. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ redoks çiftinin GC, GC/GO, GC/GO-pPy ve GC/GO-pPy-KAN* elektrot üzerindeki Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).....	33
4.9. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ redoks çiftinin 5 µL, 10 µL, 15 µL ve 20 µL GO süspansiyonu kullanılarak hazırlanmış GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).....	36
4.10. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ redoks çiftinin 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM ve 30 mM KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN molekülleri sökülmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).....	37
4.11. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ redoks çiftinin; 25 µM KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN moleküllerinin 2 M HCl ile çeşitli sürelerde sökülmesiyle GC/GO-pPy-KAN* elektrot üzerindeki Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).....	38
4.12. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ redoks çiftinin; 25 µM KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN moleküllerinin 2 M HCl ile 10 dk'da sökülmesiyle elde edilen GC/GO-pPy-KAN* yüzeylerine çeşitli sürelerde 1 µM KAN moleküllerinin inkübasyonu ile elde edilen elektrotlardaki Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).....	40
4.13. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ redoks çiftinin; 5 nM-1 µM KAN ile 30 dk muamele edilmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrot yüzeylerinden elde edilmiş Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).....	41
4.14. 5 nM-1 µM KAN ile muamele edilmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrot yüzeyindeki 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ redoks çiftinin yük aktarım dirençlerine karşılık KAN konsantrasyonu değişimi kalibrasyon grafiği.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks probun (0,1 M KCl içinde) GC, GO/GC, GC/GO-pPy ve GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki dönüşümlü voltamogramlarından (tarama hızı: 200 mV/s; referans elektrot: Ag/AgCl _(doy)) elde edilen anodik pik akımı değerleri.....	32
4.2. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks probun (0,1 M KCl içinde) GC, GC/GO, GC/GO-pPy ve GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki EIS ölçümleri sonucu elde edilen Nyquist eğrilerinden elde edilen yük aktarım dirençleri ve eşdeğer elektriksel devre modelleri	34
4.3. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin 5 µL, 10 µL, 15 µL ve 20 µL GO süspansiyonu kullanılarak hazırlanmış GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki Nyquist eğrilerinin Warburg etkili CPE elektriksel devresine göre fit edilmesi sonucu elde edilen Rct değerleri.....	36
4.4. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM ve 30 mM KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN molekülleri sökülmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki Nyquist eğrilerinin Warburg etkili CPE elektriksel devresine göre fit edilmesi sonucu elde edilen Rct değerleri	37
4.5. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin; 25 µM KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN moleküllerinin 2 M HCl ile sökülerek çıkarılma sürelerine karşılık, GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki Nyquist eğrilerinin Warburg etkili CPE elektriksel devresine göre fit edilmesi sonucu elde edilen Rct değerleri	39
4.6. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin; 25 µM KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN moleküllerinin 2 M HCl ile 10 dk'da sökülmesiyle elde edilen GC/GO-pPy-KAN* yüzeylerine çeşitli sürelerde µM KAN moleküllerinin inkübasyonu ile elde edilen elektrotlardaki Nyquist eğrilerinden elde edilen yük aktarım direnci değerleri	40
4.7. 5 nM-1 µM KAN ile muamele edilmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrot yüzeyindeki 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin yük aktarım dirençlerine karşılık KAN konsantrasyonu değişimi tablosu	42
4.8. Pct için geliştirilen yöntemin analitik veri analizi ($n=5$)	43
4.9. Literatürdeki bazı KAN tayin yöntemi sonuçları.....	43
4.10. Geliştirilen yöntemin doğruluğu ve hassasiyetini belirlemek için yapılan çalışmada birbirinden bağımsız beş seri ile gün içi ve beş ardışık günler arası Pct için DPV ölçüm sonuçlarından elde edilen veriler (N=5).....	43
4.11. 10 nM KAN için çeşitli moleküllerin ve iyonların varlığında girişim etkileri.....	44
4.12. Geliştirilen impedimetrik KAN tayin yöntemi ile gerçek numune uygulamalarının analitik sonuçları	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μM	Mikromolar
pM	Pikomolar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
μL	Mikrolitre
g	Gram
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
mL	Mililitre
μg	Mikrogram
Ag/AgCl _(doy)	Referans elektrot (gümüş/gümüş klorür)
Ar	Argon
Al	Alüminyum
AG	Aminoglikozit
O	Oksijen
H	Hidrojen
C	Karbon
S	Kükürt
OH ⁻	Hidroksii iyonu
Ag	Gümüş
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidrojen klorür
NaOH	Sodyum hidroksi
K ₄ Fe(CN) ₆	Potasyum ferrosiyanür
K ₃ Fe(CN) ₆	Potasyum ferrisiyanür
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
Py	Pirol
pPy	Polipirol
KAN	Kanamisin
GC	Camsı karbon
GO	Grafen oksit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
GC/GO	Grafen oksitle modifiye edilmiş camsı karbon
GC/GO-pPy	Polipirol modifiye edilmiş grafen oksit/camsı karbon
GC/GO-pPy-KAN	Kanamisin baskılanmış polipirol modifiye edilmiş grafen oksit/camsı karbon
GC/GO-pPy-KAN*	Kanamisin baskılanmış polipirol modifiye edilmiş grafen oksit/camsı karbon yüzeyinden kanamisinin sökülerek çıkarılmasıyla elde edilen elektrot
μM	Mikromolar
PUA	Poliüretan akrilat
PDMS	Polidimetil siloksan
PED	Pulslu elektrokimyasal algılama
XPS	X-Işınları fotoelektron spektroskopisi
SEM	Taramalı Elektron mikroskopisi
CV	Dönüşümlü voltametri
SAM	Kendiliğinden düzenlenen tek tabaka
TEM	Geçirimli elektron mikroskopisi
XRD	X-ışınları kırınımı
DPV	Diferansiyel puls voltametri
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
CAP	Klorom fenikol
CBA	Karboksi propil bağlı faz
CE	Kapılar elektroforez
CZE	Kabillerzom elektrofarezi
RF	Radyo frekansı
FHIBL	Odaklanmış helyum iyon ışını litografisi
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
DDI	Didonasin
PEDOT	Poli(3,4-etilendioksitiyofen
ELSD	Evaporatif ışık saçılma dedektörü
TH	Tiyonin
Gr-PanI	Grafen-1polianilin kompozit
SPR	Yüzey plazmon rezonans

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
SPE	Katı faz ekstraksiyonu
NP	Nanoparçacık
MCH	6-merkapton-1-heksonol
PIC	Fenilizosiyonat
LOD	Tespit sınırı (alt tayin sınırı)
LOQ	Kantitatif tayin sınırı
SNP	Silisyum oksit nanoparçacık
MSNs	Mezoporoz silisyum oksit nanoparçacık
PMMA	Poli(metil metakrilat)
TOB	Tobrasimin
GEN	Gentamisin
PEN	Penisilin
AMX	Amoksilin
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
RSD	Geri kazanım
CVD	Kimyasal buhar depolama
DNA	Deoksiribonükleik asit
IR	Infrared (kıızıl ötesi)
AgNP	Gümüş nanoparçacık
AuNP	Altın nanoparçacık

1. GİRİŞ

Bilim dünyasının kendisini sürekli yenilemesi ve geliştirmesiyle birlikte başta biyoteknoloji olmak üzere, savunma, enerji, su ve gıda yönetimi ile yaşam kalitesi alanlarında pek çok yenilikler ve güncellemeler ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu anlamda geçtiğimiz yüz yıl, 19. Yüzyıldan bakiye kalan pek çok sorunun çözümü için parlak bir yüzyıl olmuştur. Örneğin 19. Yüzyıldaki pek çok veba salgını geçtiğimiz yüzyılda sorun olmaktan çıkmıştır. Yine, astronomi vb. alanlardaki pek çok teorik kavram geçtiğimiz yüzyılda bilim insanlarının uzaya çıkmasıyla ispatlanmıştır. 21. Yüzyıl ise geçtiğimiz yüzyılda ortaya çıkan pek çok bilimsel dokümanın tatbiki için uygun bir zaman olacaktır. Özellikle insan sağlığı ve kaliteli yaşamı için pek çok yenilikler ortaya çıkmakta ve çıkmaya edecektir. Sars, Mers, Kovid-19 gibi ister doğal isterse suni yollarla geliştirilmiş pek çok virüs kökenli hastalıklar ya da bakteri kaynaklı hastalıklar günümüzde hemen teşhis edilebilmekte ve hemen antijen-antikor uyumu dikkate alınarak müdahale edilebilmektedir (Goldemberg, 1998).

İlaç teknolojisinin temel hedeflerinden birisi, sağlıklı ve kaliteli yaşama sahip bireylerin oluşturulmasına yardımcı olmaktır. Bakterileri yok eden antibiyotikler keşfi şüphesiz insan ömrünü uzatan ve kaliteli kılan yeniliklerden birisidir. Ancak doğru kullanılmı çok önemlidir. Doğru ve yerinde kullanılmayan antibiyotikler bağışıklık sistemini çökertebileceği gibi pek çok rahatsızlığa da zemin hazırlar. Bu yüzden antibiyotiklerin dozu ve kontrollü kullanımı oldukça önemlidir. Özellikle ticari olarak etinden sütünden yararlanılan hayvanlarda kullanılan antibiyotikler, insanlarda pek çok yan etkiye sebep olabilir. Antibiyotiklerin çeşitli gıda numunelerinde, kan ve idrar örneklerinde analiz edilmesi önemlidir.

Antibiyotikler çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle analiz edilmektedir (Roychoudhury vd., 2007). Son yıllarda çeşitli elektrokimyasal yöntemlerle de tayin edilmeye başlanmıştır (Hlabangana ve Memeza, 2018). Elektrokimyasal yöntemlerin diğer yöntemlere göre önemli avantajlarından birisi ucuz ve kolay yöntemler olmasıdır (Zhong vd., 2012). Bir diğer önemli avantajı ise tayin sınırının oldukça düşük konsantrasyonlara inebilmesidir (Muthusankar vd., 2020).

Bu tez çalışmasında, grafen oksitle modifiye edilmiş camı karbon (GC/GO) elektrotlar hazırlanmış ve bu elektrotların yüzeyine polipirol içinde kanamisin (KAN) baskılanmıştır. Elde edilen elektrotların elektrokimyasal, spektroskopik ve mikroskopik karakterizasyonları yapıldıktan sonra KAN tayini için yöntem elektrokimyasal impedans spektroskopisiyle (EIS)

impedimetrik yöntem geliştirilmiştir. KAN ile girişim yapması muhtemel benzer bazı moleküller ve iyonların girişim etkileri araştırılmıştır. Geliştirilen yöntemin analitik parametreleri değerlendirilmiş, süt ve su gibi gerçek numune analizinde performansları incelenmiştir.



2. TEORİK TEMELLER

2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Son yılların popüler konusu olan moleküler baskılama teknolojisi, 1972 yılında Günter Wulf ve ekibi tarafından polimer matrise üç boyutlu yapısal seçicilik kazandırmak amacıyla yapılan çalışmalarla geliştirilmiştir (Wulf vd. 1972; Wulf ve Poll, 1987; Wulf, 1995). Moleküler baskılama, kalıp molekül de denilen analitin uygun bir monomerle kompleks oluşturarak polimerize olması işlemi olarak tanımlanabilir. İlerleyen zamanda yapılan çalışmalarla birlikte moleküler baskılanmış polimer (MIP) tekniği adını almıştır (Cormack ve Elorza, 2004). Bu işlem için, ilk önce seçilen molekül, polimerleşmeyle birlikte ısı ve basınç gibi etkenler eşliğinde polimer içine baskılanır ve daha sonra polimer matrisin içinden sökülerek alınır. Hazırlanan baskılanmış polimerin uzun süre kararlılığını koruması, düşük maliyeti ve kolay uygulanabilir bir yöntem olması nedeniyle MIP tekniği oldukça sık kullanılmaya başlamıştır (Ensing vd., 2001; Rao vd., 2004; Piletska vd., 2009).

Moleküler baskılama yöntemi genel olarak üç aşamada gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi kompleksleşme aşamasıdır. Baskılanacak hedef molekülün üç boyutlu yapısı ile fonksiyonel monomer (Akrilik asit, metakrilik asit, metakrilamid, 2-akrilamido-2-metilpropan sülfonik asit, triflorometil akrilik asit, akrilamid, 2-vinilpiridin, 4-vinilpiridin, 2-hidroksietilmetakrilat 1-vinilimidazol, N,N'-dietil aminoetil metakrilamid, allilamin, 2-hidroksietil metakrilat, metil metakrilat, stiren, etil stiren) gibi çeşitli etkileşimlerle kompleksleştirilir. İkinci aşamada ise polimerizasyon aşamasıdır. Eğer bir radikal polimerleşmesi yapılacaksa bir radikal başlatıcının ısıyla bozunmayla işlem başlatılabilir. Ancak baskılanacak molekülle monomer arasında kovalent etkileşim fazla ise düşük sıcaklıklarda fotokimyasal başlatıcılarla polimerleşme başlatılır. Monomer, baskılanan molekülü içine alacak şekilde aşırı çapraz bağlayıcıyla (Etilen glikol dimetakrilat, divinilbenzen, trimetilolpropan trimetakrilat gibi) polimerleşir. Üçüncü aşama ise hedef molekülün (kalıp molekül) polimer matristen sökülerek uzaklaştırılmasıdır (Andersson, 2000; Ye ve Mosbach, 2001; Hishiya vd., 2003; Sellergren ve Allender; 2005).

Seçilen polimerin, baskılanacak hedef molekülle etkileşme türü çok önemlidir. Bir kovalent baskılama söz konusu ise hedef molekül ile monomer kompleksi ketal, esterler, amidler ve boronik asitlerin tersinir bağlanmasıyla elde edildiğinden kararlı kalıp-monomer kompleksi oluşur ve bağlanma bölgeleri homojen olarak dağılır (Wulff vd., 1972; Shea vd., 1986; Sellergren

ve Andersson, 1990). Ayrıca, oluşan konjugatlar kovalent bağlarla bağlı olduğu için polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH gibi) istenildiği gibi uygulanabilir. Ancak, kovalent baskılamanın dezavantajları da vardır. Baskılanacak molekül ile monomer arasındaki etkileşimlerden dolayı polimerleşme esnasında sürekli sorunlar çıkacağından polimerleşme işlemi çok ekonomik olmaz. Baskılanacak molekülün polimere tersinir olarak bağlanma miktarı kısıtlıdır. Meydana gelen kovalent bağın etkisiyle bağlanma hızı zayıflar ve polimerizasyon sonrasında baskılanmış molekülün matristen sökülerek uzaklaştırılması zorlaşır. (Takeuchi ve Haginaka, 1999; Hishiya vd., 2003). Kovalent olmayan moleküler baskılama yönteminde ise; baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasında kovalent olmayan etkileşimler olduğu için oluşacak polimer içinde baskılama çok daha başarılı olmaktadır. (Arshady ve Mosbach, 1981; Vlatakis vd., 1993). Bu tür baskılanmış molekül, polimer matrisinden sökülerek alınabilmekte ve tekrar etkileştirilebildiğinde boşlukları doldurmaktadır (Wulff ve Knorr, 2002; Marty ve Mauzac, 2005; Yan ve Row, 2006). Sonuç olarak kovalent olmayan baskılama, kovalent baskılama yöntemine göre daha kolaydır ve kovalent bağlanmaya göre daha yüksek afiniteye sahip bağlanma bölgeleri oluşturmaktadır (Hishiya vd., 2003).

Son yıllarda elektrot yüzeyinde kimyasal polimerizasyon ya da elektrokimyasal polimerizasyonla da elektrot yüzeyinde moleküler baskılama çalışmaları yaygın hale gelmeye başlamıştır (Adumitrachioaie, vd., 2018). Özellikle bir analit ile pirolün elektrokimyasal reaksiyonla baskılanması suretiyle elektrot yüzeyinde MIP elde edilerek çeşitli analit uygulamaları yapılmaktadır. Elektrokimyasal çalışmalarda analitin elektroaktif bir molekül olması şart değildir. Çünkü redoks proplar yardımıyla elektrokimyasal impedans spektroskopisiyle (EIS) ölçümler alınarak analit tayin edilebilmektedir (Uygun ve Dilgin, 2013). Ayrıca, analit elektroaktif grup içeriyorsa voltametrik tayin de yapılabilir (Long vd., 2015).

MIP çalışmaları genel olarak ilaç, gıda, biyolojik ve çevresel numunelerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wu vd., 2016., Bakhtiar, vd., 2015). Aynı zamanda, adsorpsiyon temelli ayırma ve zenginleştirme çalışmalarında da etkin olarak kullanılmaktadır. MIP, özellikle ilaç aktif maddelerinin katı faz ekstraksiyonunda, biyokimyasal (DNA, RNA, peptit, enzim, hormon vb.) numunelerin saflaştırılmasında önemli rol oynar.

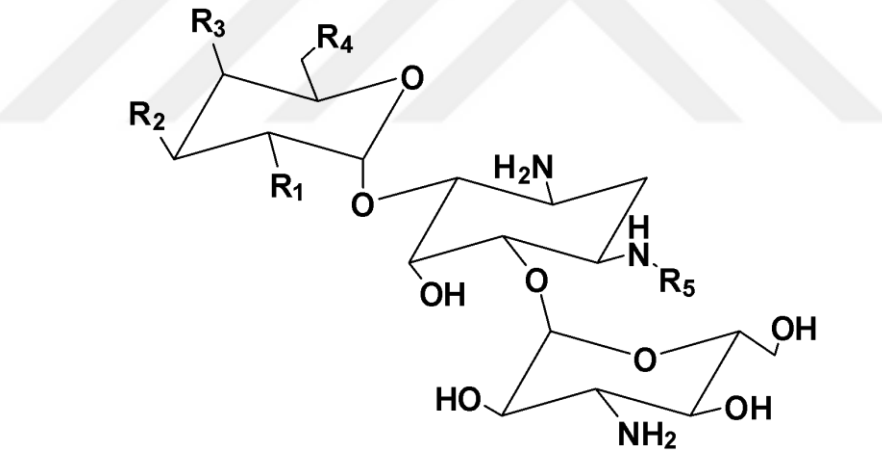
2.2. Kanamisin ve Özellikleri

Kanamisin (KAN); mol kütlesi 484,499 g/mol olan $C_{18}H_{38}N_4O_{15}S$ kapalı formülüne sahip, karbon (C), hidrojen (H), azot (N), oksijen (O) ve kükürt (S) elementlerini içeren, yaygın

olarak kullanılan aminoglikozit grubundan olan Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterileri kaynaklı hayvan enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan yaygın bir antibiyotiktir (Zhang, vd., 2019). *Streptomyces kanamyceticus* isimli bakteriden özütlenmektedir (Zengin vd., 2014).

Bu tür antibiyotiklerin etkileri hakkında bilinen en özelliklerinden birisi bakteri ribozomlarına bağlanarak protein sentezini bozmasıdır (Wang vd., 2016; Lee vd. 2011) Güçlü bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkisi ve akut tedavisi bilinen KAN, çok sayıda bakteri enfeksiyonunda kullanılmaktadır. KAN'ın hayvanlarda yaygın kullanımı, hayvansal gıdalarda antibiyotik kontaminasyonunun artması endişesine yol açmaktadır. (Wang vd., 2016). KAN'ın bu şekilde gıda zinciriyle insan vücuduna da birikmesi, iştah kaybı (Xu vd., 2014), böbrekte hasar (Oertel vd., 2004) ve alerjik reaksiyonlar (Ha vd., 2017a) gibi çeşitli rahatsızlıklara sebep olabilir.

KAN'ın çeşitli formları vardır. Bunlardan en çok bilinenleri, kanamisin A (KANA), kanamisin B (KANB) ve kanamisin C (KANC) (Zhou vd. 2007)'dir. (Şekil 2.1). KANA, kanamisin sülfat şeklindedir.



Bileşik Adı	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
KANA	OH	OH	OH	NH ₂	H
KANB	NH ₂	OH	OH	NH ₂	H
KANC	NH ₂	OH	OH	OH	H

Şekil 2.1. Bazı kanamisin türevleri.

KAN, ilaca dirençli mikroorganizmaların sebep olduğu tüberkülozun tedavisi için de yardımcı ilaç olarak kullanılmaktadır (Kumari vd., 2018). KAN'ın çok fazla sayıda bakteriye karşı etkin tedavide kullanılıyor olması özellikle hayvansal gıdalarda kontaminasyon miktarının belirlenmesinde önem arz etmektedir. Bu nedenle, birçok ülkeden kuruluşlar gerçek numuneden

kanamisin tayini için yüksek hassasiyet ve seçicilikte tekniklerin gerektiği veteriner ilaçlarıyla tedavi edilmiş veya biyosidallara maruz kalmış hayvanlardan gelen yiyecek maddelerindeki kanamisin miktarı için maksimum kalıntı limiti belirlemiştir. Bu kapsamda, kanamisinin sütteki maksimum kalıntı limitini Kore Gıda ve İlaç Kurumu 0.1 ppm (0.1 mg/kg) ve Avrupa Birliği ise 0.15 ppm (0.15 mg/kg) olarak belirlemiştir. (Wang vd., 2013; Lim vd., 2012; Ha vd., 2017b). Sadece et, süt ve süt ürünleri ile içme sularında değil pek çok kan, idrar vb. numunelerde de antibiyotik kalıntısının olup olmadığını belirlemek önemli olduğu için çok çeşitli analiz yöntemleri geliştirilmiştir (Zengin vd., 2014). Genel olarak, kanamisin için analitik yöntemlerin büyük kısmı nitel analiz açısından faydalı olan yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresini içerir (Isoherranen ve Soback, 1999; Blanchaert vd., 2013). Fakat kromatografi teknikleri, pahalı ve büyük ekipmanlar, profesyonel operatörler gerektirmekte ve tayinleri zaman almaktadır (Wang vd., 2017; Pundir ve Batra, 2015). Dolayısıyla, kanamisinin basit ve hızlı tayini için kolorimetrik (Song vd., 2011), floresans spektroskopisi (Ha vd., 2017b), ve elektrokimyasal (Zhu vd., 2012) biyosensör teknikleri içeren yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3. Kanamisin Tayini

Hayvanlardaki bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın kullanılan antibiyotiklerden biri olan KAN'ın hayvansal gıdalarda ve çevresel numunelerde miktarının belirlenmesinin önemi önceki bölümde belirtilmiştir. Besin zinciri yoluyla insana geçerek vücutta biriken ve insan sağlığı için tehlike arz eden KAN'in eser miktarda tayini için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Literatürden kısaca derlenen bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

KAN tayini için en yaygın kullanılan yöntemlerin başında kromatografi teknikleri gelmektedir. Bu konuda, sıvı ve gaz kromatografisiyle (Preu, vd., 1998) yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. HPLC ile geliştirilen KAN tayin yöntemleri hakkında 2019 yılında bir derleme makalesi (review article) yayımlanmıştır (Zhang, vd., 2019). Bu makalede, mor ötesi (Blanchaert vd., 2013), floresans (Wang ve Peng, 2008), buharlaşmalı ışık saçılması (Megoulas ve Koupparis, 2005), pulslu elektrokimyasal (Manyanga, vd., 2010) ve kütle spektrometrisi (Cheng, vd., 2010) dedektörlü HPLC çalışmalarının çeşitli biyokimyasal ve gıda numunelerinde uygulamaları incelenmiştir. Bu yöntemlerin LOD değerleri ve gerçek numune analizlerindeki % geri kazanım değerleri verilmiştir. Her ne kadar literatürde kromatografi teknikleriyle KAN tayini yaygın olsa da bu tekniklerinin diğer tekniklere göre pratik olmaması, pahalı olması ve uzun cevap süresine sahip olması araştırmacıların farklı analiz yöntemleri geliştirmesine sebep olmuştur. Bu

kapsamda KAN tayini için kapiler elektroforez, enzim bağı immünosorbent analizi, yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), yüzey plazmon rezonans (SPR) ve Kuartz kristal mikrobals (QCM) gibi çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir.

Yapılan çalışmaların birinde, 2-merkaptobenzotiyazol (MBT)'ün Raman etiketi olarak kullanılmasıyla KAN için SERS tabanlı tayin yöntemi geliştirilmiştir. SERS etkisi, gümüş nanoparçacığın (AgNP) çekirdek, altın nanoparçacığın (AuNP) kabuk olarak kullanıldığı bimetalik nanoparçacıklarla ve yüzeyde magnetit kullanılmasıyla sağlanmıştır (Zengin, vd., 2014). Geliştirilen yöntemin LOD değeri 2 pg/mL olarak hesaplanmıştır. Başka bir çalışmada ise kapiler elektroforez kullanılarak KAN tayini yapılmıştır (Long vd. 2003). 5-40 µg/mL lineer çalışma aralığında geliştirilen yöntemin LOD değeri 2 µg/mL; 0,4-5 µg/mL lineer çalışma aralığında ise 0,4 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemle KAN tayini için insan serumu numuneleri kullanılarak başarılı uygulama imkânı bulunmuştur. KAN tayini için literatürde daha farklı yöntemler de bulunmaktadır. Örneğin, enzim bağı immünosorbent analizi (Kitagawa, vd., 1983) ve yüzey plazmon rezonans (SPR) (Zhang, vd., 2018) araştırmacılar tarafından tercih edilen yöntemlerdir.

Yukarıda bahsedilen metotların birçoğu zaman alan, uğraştırıcı ve birçok çözücüyle beraber pahalı ekipman gerektiren metotlardır. Bu nedenle, KAN tayini için düşük maliyetli, seçici ve hassas metotların geliştirilmesi istenmektedir. Elektrokimyasal tayin yöntemleri bu amaç için en uygun sensör tekniklerinden biridir. KAN tayini için elektrokimyasal çalışmalar genellikle voltametrik ve impedimetrik olmak üzere iki farklı teknikte yoğunlaşmıştır.

He ve Yan (2018) Au@Pt nanoparçacıkları içeren tiyonin esaslı voltametrik teknikle KAN aptasensörü geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemin çalışma aralığı 1 pM-1 µM olup LOD değeri 0,16 pM'dır. Bu yöntemi tabuk numunesine uygulayarak KAN'in geri kazanım değerlerini oldukça yüksek bulmuşlardır. Bir diğer çalışmada Zhang ve ekibi (2018) KAN tayini için grafen/AuNP içeren bir aptasensör çalışması yapmışlardır. DPV ölçümlerinde 0,1 pM-10 pM çalışma aralığında LOD değerini 0,03 pM olarak vermişlerdir. Gerçek numune olarak süt kullanarak oldukça başarılı geri kazanım değerleri elde etmişlerdir. Yine bir başka çalışmada perde baskılı karbon elektrot kullanılarak KAN tayini için impedimetrik aptasensör geliştirilmiştir. 1,2 ng/mL–75 ng/mL çalışma aralığında LOD değerini 0.11 ng/mL olarak elde etmişlerdir. Hazırlanan sensörü süt numunelerine uygulayarak başarılı geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Daha farklı elektrokimyasal çalışmalardan bazılarının performans sonuçları 4. Bölüm sonunda Çizelge 4.9'da karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Yöntem bakımından literatürle karşılaştırıldığında, bu tez çalışmasında, kısmen daha karmaşık olan aptamer immobilizasyonu yöntemleri yerine, polipirol içine KAN molekülünü doğrudan baskılayarak elde edilen MIP sensörü ile literatürdeki çalışmalara göre daha pratik, maliyeti düşük ve cevap süresi kısa bir impedimetrik sensör geliştirilmesi hedeflenmiştir.

2.4. Grafen Oksit (GO) Elektrot Olarak Kullanılmasının Önemi

Bilindiği üzere grafen oksit, karbon allotropu olan grafitin elektrokimyasal veya kimyasal reaksiyonlar yardımıyla birkaç veya tek tabakalar halinde açılmasıyla elde edilmektedir (Erkal vd., 2016). Tabaka kalınlığı arttıkça yapı grafit oksit ismini alır. Grafenden farklı olarak GO yüzeyinde $-C=O$, $-COOH$, $-OH$ gibi fonksiyonel gruplar ve halkalar üzerinde pi bağları bulunmaktadır (Novoselov vd., 2004). Grafen oksit, tabaka kalınlığı ya da yüzey modifikasyon miktarı arttıkça iletkenlik bakımından zayıflar (Erkal vd., 2015).

Günümüzde pek çok literatürde GO ve türevleriyle (indirgenmiş grafen oksit, rGO vb.) ile modifiye edilmiş elektrotlar üzerinde elektrokimyasal çalışmalar çalışılmaktadır (Yavuz vd., 2016; Kariper vd., 2019; Yun vd., 2015). GO modifikasyonu ile birlikte elektrot yüzey alanındaki artma elektroaktif türün elektron aktarımı esnasında meydana gelen pik akımını arttırmaktadır. Özellikle tek tabakalı GO yapılarıdaki pi bağı lokalizasyonu ile elektrot iletkenliği artmaktadır. Bu yüzden sentezlenen GO'lerin mümkün tek tabakalı miktarının fazla olması önemlidir. Ayrıca GO modifikasyonu esnasında iletkenliğin azalmaması için çok kalın katmanların oluşması engellenmelidir. Bu amaçla kullanılacak GO miktarı ve hazırlanan modifiye elektrotun bir ultrasonik banyoda sonike edilmesi önemlidir (Çelik vd., 2016).

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan bütün kimyasallar HPLC saflığında olup Merck, Fluka, Sigma-Aldrich ve Riedel firmalarından temin edilmiştir. Kanamisin sülfat (KANA) Sigma-Aldrich'den alınmıştır. Elektrokimyasal ölçümler yüksek saflıkta argon gazı (%99,999) altında olup aksi belirtilmedikçe oda sıcaklığında (24 ± 1 °C) alınmıştır. Sulu çözeltilerin hazırlanmasında ve yıkama işlemlerinde Human Power 1+ sisteminden elde edilen ultra saf su (UPW $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) kullanılmıştır. Elektrokimyasal ölçümler için üçlü elektrot sistemi kullanılmış olup karşıt elektrot olarak Pt tel, referans elektrot olarak Ag/AgCl_(doygun), çalışma elektrotu olarak ise camsı karbon (GC) veya modifiye edilmiş GC kullanılmıştır. Camsı karbon (GC) elektrot kullanılmadan önce 100 ve 50 μm 'luk alümina süspansiyon ile temizlenerek asetonitril-izopropil alkol (1:1, v:v) karışımında ve saf su ile bir ultrasonik banyoda (Bandelin, Sonorex, 35 kHz) 5'er dk sonike edilerek kullanılmıştır.

3.2. Grafen Oksit (GO) Hazırlanması ve GC Yüzeyine Modifikasyonu

Grafen oksit modifiye edilmiş Hummer's Yöntemi ile hazırlanmıştır (Hou vd., 2010). 2,5 g grafit ile 15 mL H₂SO₄ iyice karıştırıldıktan sonra üzerine 2,5 g K₂S₂O₃ ve 2,5 g P₂O₅ dikkatlice eklenmiştir. Karışım, geri soğutucu altında 80°C'de 6 saat ısıtıldıktan sonra soğutulmuş, saf su ile yıkanarak süzölmüştür. Elde edilen ürün, bir tuz-buz banyosunda 125 mL'lik soğuk H₂SO₄ içerisinde konulmuştur. Üzerine 15 g KMnO₄, sıcaklık 20°C'nin altında tutulacak şekilde yavaş yavaş ilave edilmiştir. Eklenme işlemi tamamlandıktan sonra üzerine 250 mL UPW eklenmiş ve bir manyetik karıştırıcı üzerinde 35°C'de ile 4 saat karıştırılmıştır. Üzerine 750 mL saf su eklenerek seyreltme işlemi yapılmıştır. Son karışım üzerine hızlı bir şekilde 20 mL %30 H₂O₂ eklenmiş iyi bir karıştırma işlemi ile köpüren çözeltinin renginin turuncu-kahve olması gözlenmiştir. 1 gece oda şartlarında karıştırıcıda karıştırılarak bekletilen süspansiyon 10.000 rpm'de ultrasantrifüj (Hermle Z36HK, Almanya) ile 10 dk santrifüjlenerek GO çökeleği elde edilmiştir. Çökelek 0,1 M HCl çözeltisi ile 3 defa yıkanarak her defasında santrifüj edilerek saflaştırılmıştır. Elde edilen GO, 55 °C'de vakumlu etüvde 12 saat bekletilerek kurutulmuştur (Erkal vd., 2015).

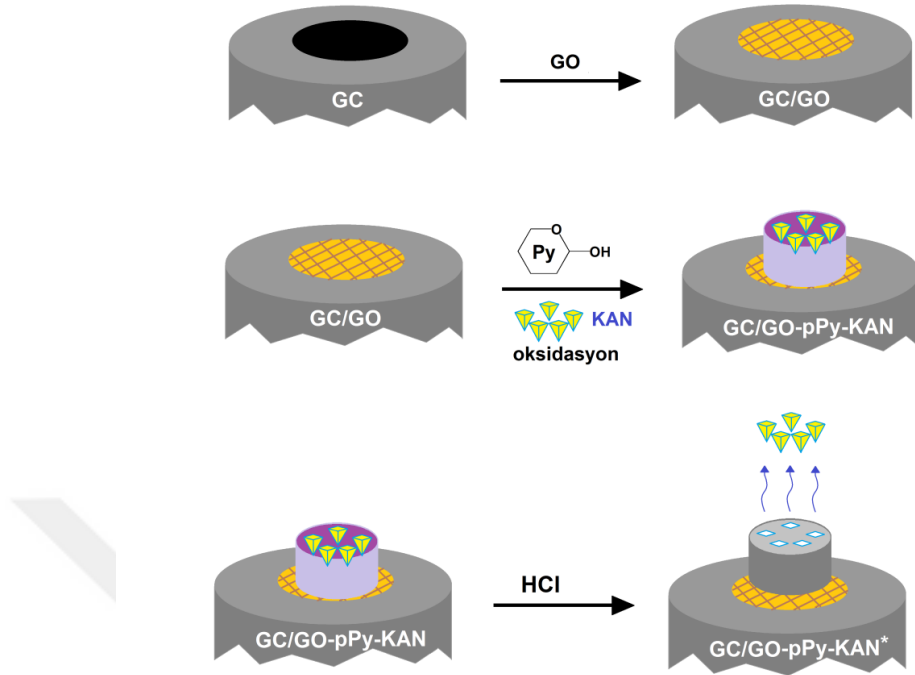
Elde edilen GO'dan 100 mg alınarak asetonitrille 5 mL süspansiyon hazırlanmıştır. Süspansiyon'dan 5 μL , 10 μL , 15 μL ve 20 μL alınarak önceden temizlenen GC yüzeyine damlatılarak IR lambası altında 10 dk bekletilerek GO'nun GC yüzeyine modifikasyonu

(GC/GO) sağlanmıştır. Her bir GO yüzeyi KAN içeren pirol ile modifiye edilip KAN molekülleri sökülerek GC/GO-pPy-KAN* elektrotlara dönüştürülmüştür. İmpedimetrik ölçümlerden ideal GO süspansiyon miktarı 10 µL olarak belirlenmiştir.

3.3. KAN Molekülü Baskılanmış Polipirol Modifiye GC/GO Yüzeyin Hazırlanması

GC/GO elektrot, pH=7 PBS tamponunda (0,1 M KCl çözeltisi içinde) 50 mM pirol ve sırasıyla 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM ve 30 mM KAN içeren çözeltilere daldırılarak elektrokimyasal oksidasyonla 5 çevrimde modifiye edilmiştir. Potansiyel pencere olarak 0/1800 mV aralığı, tarama hızı olarak 50 mV/s tercih edilmiştir. Moleküler baskılama esnasında ideal KAN konsantrasyonunun 25 mM olduğu impedans ölçümleriyle belirlenerek modifiye edilen elektrot GC/GO-pPy-KAN olarak kısaltılmıştır (Uygun ve Dilgin, 2013).

GC/GO-pPy-KAN elektrot içindeki KAN moleküllerinin sökülerek moleküler boşluk oluşturabilmek için 2 M HCl çözeltisi (Uygun ve Dilgin, 2013) içinde GC/GO-pPy-KAN elektrot sırasıyla 1, 5, 10 ve 15 dk bu çözeltinin içerisinde sabit hızda karıştırılarak sökülülmüştür. İdeal KAN'i alma süresinin impedans ölçümlerinden 10 dk olduğu anlaşılmıştır. KAN'e uygun boşluklar oluşturulan elektrot GC/GO-pPy-KAN* olarak kısaltılmıştır. Şekil 3.1'de GC yüzeyine GO'in modifiye edilişi, GC/GO yüzeyinde pirol ve KAN karışımının baskılanarak polimerleşmesi ve HCl ile muamele sonunda polimer içine doplanan KAN moleküllerinin sökülerek KAN boşluklu GC/GO-pPy-KAN* oluşturulması şema olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1. GC/GO-pPy-KAN* yüzeyinin oluşturulması şeması.

3.4. Hazırlanan Malzemelerin ve Elektrotların Karakterizasyonu

Hazırlanan GO, Raman (Horiba, Jobin-Ivon, Fransa) ve SEM (Nova, NanoSEM-650, Belçika) teknikleriyle karakterize edilmiştir. GC/GO-pPy-KAN ve GC/GO-pPy-KAN* yüzeylerinin AFM (Park Systems AFM, NX10, G. Kore) görüntüleri ve XPS (PHI 5000 VersaProbe, Japon/A.B.D.) spektrumları alınmıştır. Elektrokimyasal ölçümler (CV ve EIS) Ivium CompactStat (Hollanda) elektroanalizör ile alınmıştır. Redoks prob çözeltisi olarak, 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ karışımı 0,1 M KCl içinde hazırlanarak kullanılmıştır. Karakterizasyon ve tayin yöntemlerinde kullanılan bütün elektrokimyasal ölçümler 5'er kez tekrarlanmıştır ($n=5$).

3.5. Modifiye Elektrot Üzerinde KAN Tayini için Yöntemi Geliştirilmesi

İmpedimetrik KAN tayini yapılmadan önce bazı optimizasyon parametreleri yukarıda belirtildiği impedans ölçümleriyle belirlenmiştir. Bu optimizasyon parametreleri;

- 100 mg GO/5 mL asetonitril çözeltisinin GC yüzeyine damlatılma hacminin belirlenmesi
- 50 mM pirol içine karıştırılarak moleküler baskılanacak KAN konsantrasyonunun belirlenmesi

- KAN katkılanmış polipirol modifiye elektrotlardan 2 M HCl içinde KAN'ın sökülerek çıkarılması için gereken ideal sürenin belirlenmesi şeklindedir.
- Son olarak bir diğer optimizasyon parametresi ise, kalibrasyon çalışmalarında kullanılacak çeşitli konsantrasyonlardaki KAN standartlarının GC/GO-pPy-KAN* yüzeyindeki boşluklara tutunması için gereken ideal sürenin belirlenmesidir. Bunun için standart numuneler içinde elektrotların bekleme süreleri 10 dk, 20 dk, 30 dk ve 40 dk olarak seçilmiştir. İdeal sürenin 30 dk olduğu anlaşılmıştır. Bu parametrede GC/GO-pPy-KAN* yüzeyine 1 μ M KAN standardının ideal bağlanma süresinin belirlenmesi şeklinde ifade edilmiştir.

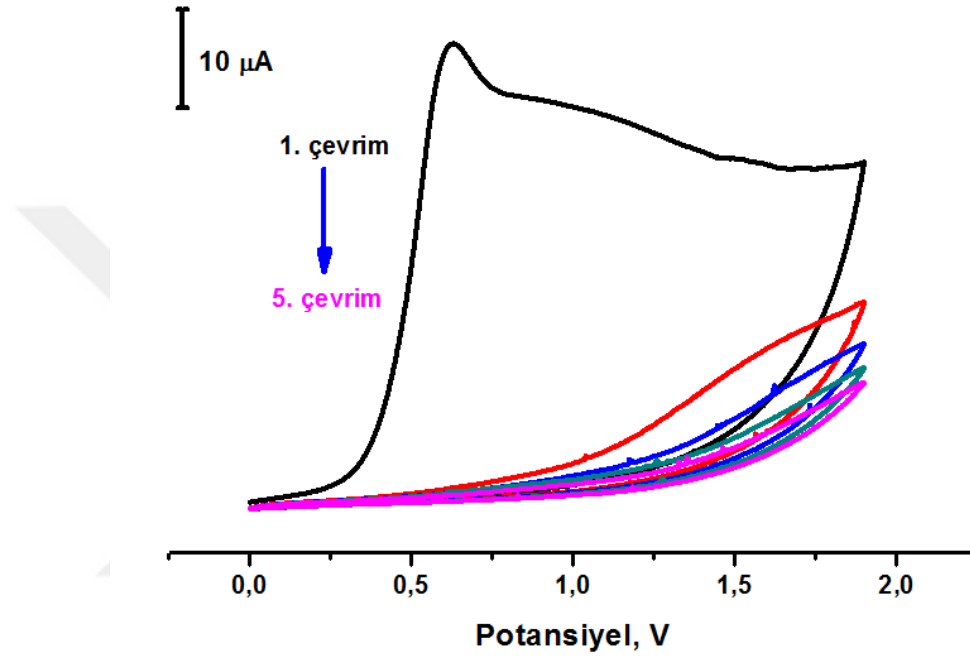
KAN'ın kalibrasyon ölçümleri 5 nM-1 μ M konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Elde edilen Nyquist eğrileri değerlendirilerek bu konsantrasyon aralığı için kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemin doğruluk ve kesinliği gün içi ve ardışık 5 gün için günler-arası olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemle KAN tayinini bozabilecek bazı molekül ve iyonlar varlığında GC/GO-pPy-KAN* elektrot yüzeyinde KAN ile girişimde bulunması muhtemel iyon ve moleküller etkileştirilerek girişim deneyleri yapılmıştır. Bunun için 10 nM KAN ile birlikte 1 μ M tobramisin (TOB) ve 1 μ M gentamisin (GEN) ve 1 μ M penisilin (PEN), 1 amoksilin 1 μ M (AMX), 1 mM Na⁺, 1 mM NH₄⁺ baskılanmış ve impedimetrik KAN tayini yapılmıştır.

3.6. Gerçek Numune Analizi

Çeşme suyu numunesi doğrudan kullanılarak analiz edilmiştir. Süt numuneleri ise ilk olarak 10'ar mL alındıktan sonra 1 mL %10'luk triklor asetik asit ile (TCA, % m/v) muamele edilip 30 s gibi kısa sürede iyice karıştırılıp hemen 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra çözelti kısmı biriktirilmiş, çökelek kısmı ise saf su ile iyice yıkanarak tekrar santrifüj edilmiş ve süzöntü kısmı önceki çözeltiliye ilave edilmiştir. Biriktirilen çözelti pH=7 fosfat tamponu ile tamponlanarak (0,1 M KCl destek elektrolit ortamında) analiz edilmiştir (Ruyck ve Ridder, 2007).

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Aşağıda 25 mM KAN içeren 50 mM pirolün GO damlatılarak modifiye edilmiş camı karbon (GC/GO) elektrot yüzeyine CV tekniğiyle beş çevrimde kaplanmasına ait voltamogramlar Şekil 4.1’de verilmiştir.

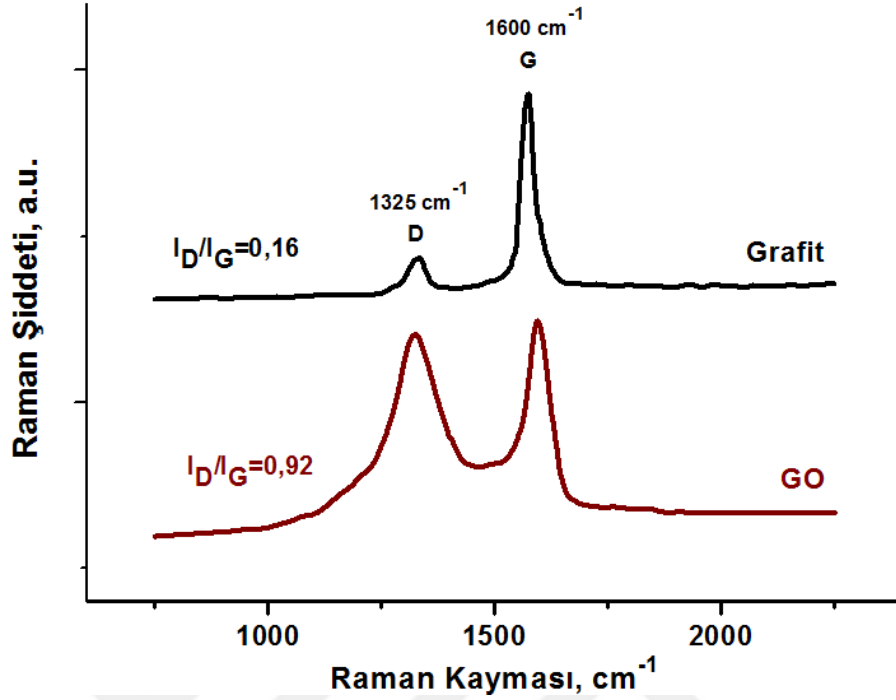


Şekil 4.1. 25 mM KAN içeren 50 mM pirolün pH=7 PBS tamponunda (0,1 M KCl destek elektrolit içinde, Ag/AgCl referans elektrota karşı) beş çevrimlik dönüşümlü voltamogramları (tarama hızı: 50 mV/s).

Şekilden de anlaşıldığına göre KAN molekülleri içeren pirol, GC/GO elektrot yüzeyine CV tekniği ile modifiye edilmiştir ve polimerleşerek elektrot yüzeyine polipirol olarak kaplanmıştır. İlk çevrimden sonra modifikasyonun büyük kısmı tamamlanmış, 2. ve 3. çevrim ile modifikasyon sona ermiştir (Üstündağ ve Solak, 2009). Her defasında aynı standart çalışmalar yapılması bakımından çevrim sayısı beş olarak belirlenmiştir. Modifiye elektrot GC/GO-pPy-KAN olarak isimlendirilmiştir.

4.1. Moleküller Baskılanmış Elektrotların Karakterizasyon Sonuçları

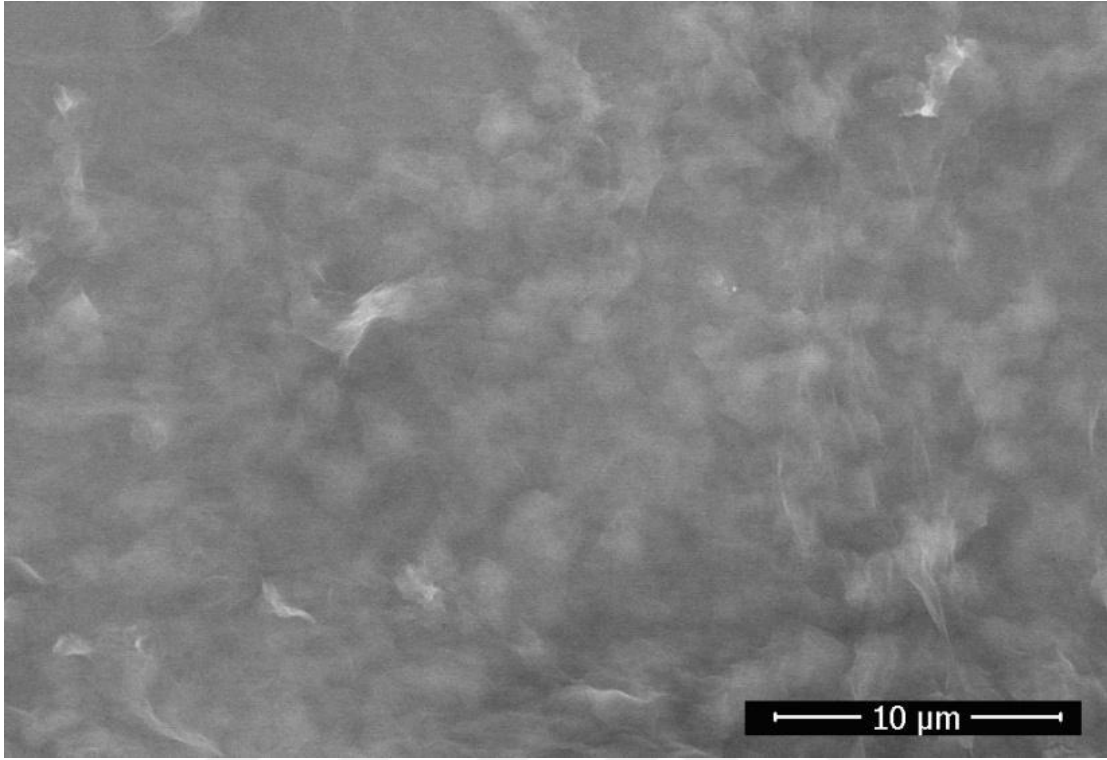
Modifiye Hummer’s yöntemiyle hazırlanan grafen oksit (GO)’lerin karakterizasyonu Raman ölçümleriyle yapılmıştır. GO ve grafitin Raman spektrumları Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. GO ve grafitin Raman Spektrumları.

Yukarıda, Şekil 4.2'den anlaşılacağı üzere G bandı karbon atomundaki düzenli/aromatik yapılara yani sp^2 hibritleşmelerine karşılık gelir. D bandı ise daha düzensiz sp^3 hibritleşmeli yapılara karşılık gelmektedir. I_D/I_G Raman şiddeti oranlarına baktığımızda grafitte ($I_D/I_G=0,16$) daha düzenli sp^2 yapıları mevcutken, grafitin kimyasal oksidasyonla açılması sonucu sp^2 hibritleşmelerinde bozulmaların meydana geldiği ve GO'daki karbona ait D bandının şiddetinin G'ye nispeten arttığı görülmektedir ($I_D/I_G=0,92$). Bu da literatürle uyumlu olarak grafitin kimyasal oksidasyonla tabakalar halinde parçalanarak GO'ya dönüştüğüne işaret etmektedir (Kim vd., 2013; King vd., 2016; Noor vd., 2018).

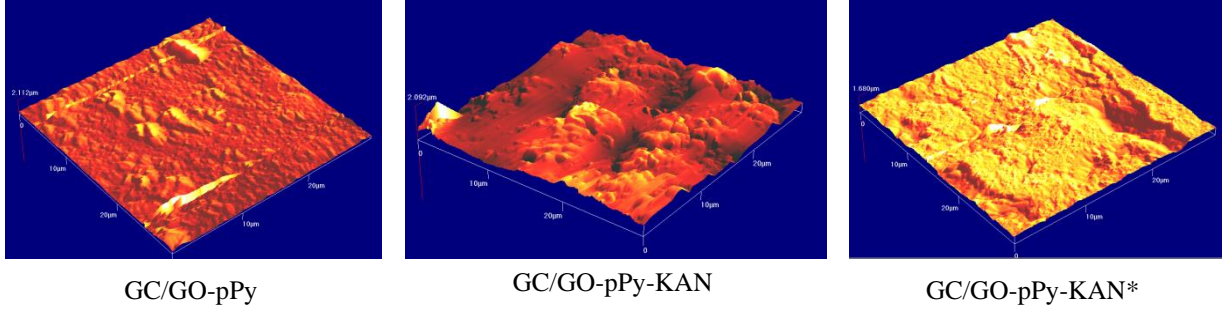
Hazırlanan GO yapıların SEM görüntüleri Şekil 4.3'de verilmiştir. Şekil 4.3'den anlaşılacağı üzere grafitin parçalanarak GO tabakalarına dönüştüğü buruşmuş tabakalardan anlaşılmaktadır. SEM görüntüleri toz GO'in bant üzerine yapıştırılmasıyla elde edildiği için fazlaca buruşukluğun meydana gelmesi normaldir.



Şekil 4.3. GO'nun SEM görüntüsü.

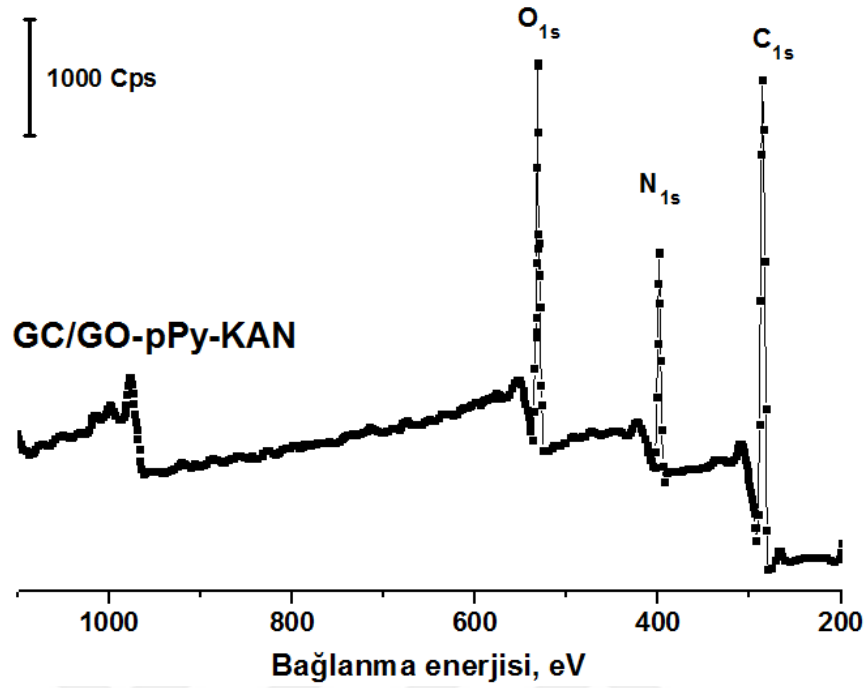
Hazırlanan elektrotların (GC/GO-pPy, GC/GO-pPy-KAN ve GC/GO-pPy-KAN*) yüzeylerinin AFM görüntüleri Şekil 4.4'de verilmiştir.

GC/GO-pPy, GC/GO-pPy-KAN ve GC/GO-pPy-KAN* yüzeylerinin AFM görüntüleri Şekil 4.4'de verilmiştir. Görüntülere göre GC/GO-pPy belirli bir yüzeye sahipken, KAN baskılanmış hali olan GC/GO-pPy-KAN yüzeyin pürüzlülüğü artmış üst üste tabakaların bindiği anlaşılmıştır. KAN moleküllerinin polimer filmde sökülmesiyle birlikte pürüzlülüğü azalmış daha homojen dağılımlı küçük gözenekli bir yüzey meydana gelmiştir. Bu yüzey, GC/GO-pPy'de olduğu gibi sadece pPy içermesine rağmen baskılandığı için gözenek boşlukları fazladır.

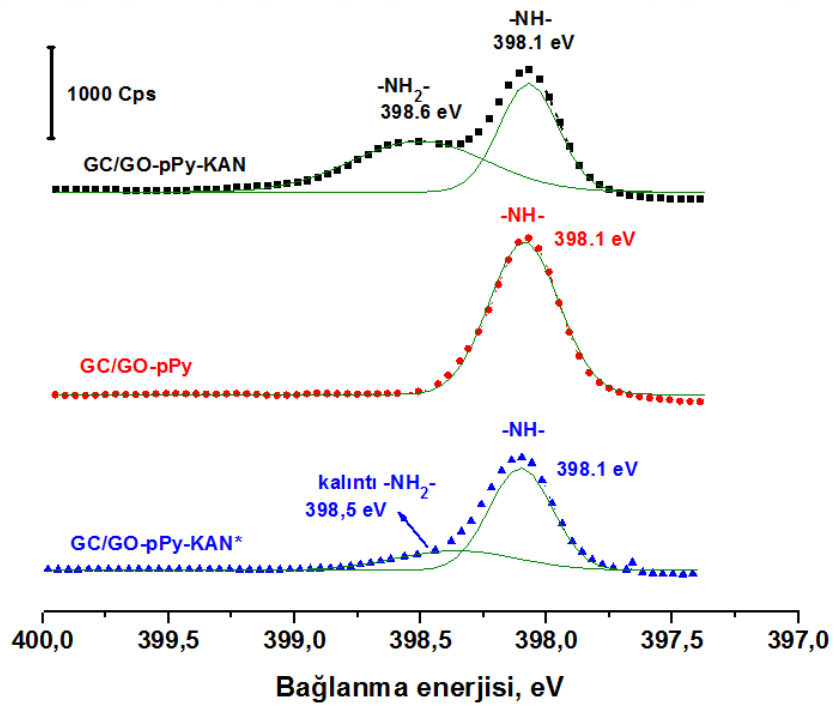


Şekil 4.4. Hazırlanan elektrotların (GC/GO-pPy, GC/GO-pPy-KAN ve GC/GO-pPy-KAN*) AFM görüntüleri.

X-Işınları fotoelektron spektroskopisiyle (XPS) karakterizasyonlarda N_{1s} bağlanma enerjilerinden yararlanılmıştır. Şekil 4.5'te sadece GC/GO-pPy-KAN numunesi için elde edilen genel XPS spektrumu verilmiştir. Spektrumda N_{1s} , C_{1s} ve O_{1s} pikleri görülmektedir. GC/GO-pPy, GC/GO-pPy-KAN ve GC/GO-pPy-KAN yüzeylerinin her birinde GO bulunduğu için bütün yüzeylerin ihtiva ettiği C_{1s} ve O_{1s} değişimleri üzerinden yüzeyleri karakterize etmek doğru değildir bu yüzden Şekil 4.6'da GC/GO-pPy, KAN baskılanmış GC/GO-pPy-KAN ve KAN molekülleri sökülmüş GC/GO-pPy-KAN* elektrot yüzeylerinin N_{1s} dar bölge XPS spektrumları verilmiştir. Polipirol içeren yüzeyde (GC/GO-pPy) $-NH-$ fonksiyonel grupları vardır. KAN molekülleri serbest $-NH_2$ fonksiyonel gruplarına sahiptirler (He et al., 2017). KAN baskılanmış yüzeyde (GC/GO-pPy-KAN) ise $-NH-$ ve $-NH_2$ fonksiyonel grupları ihtiva eden iki farklı N_{1s} bağlanma enerjisi mevcuttur. KAN molekülleri sökülmüş GC/GO-pPy-KAN* yüzeyde ise $-NH_2$ fonksiyonel gruplarına ait N_{1s} spektrum şiddetinin oldukça azaldığı görülmektedir.

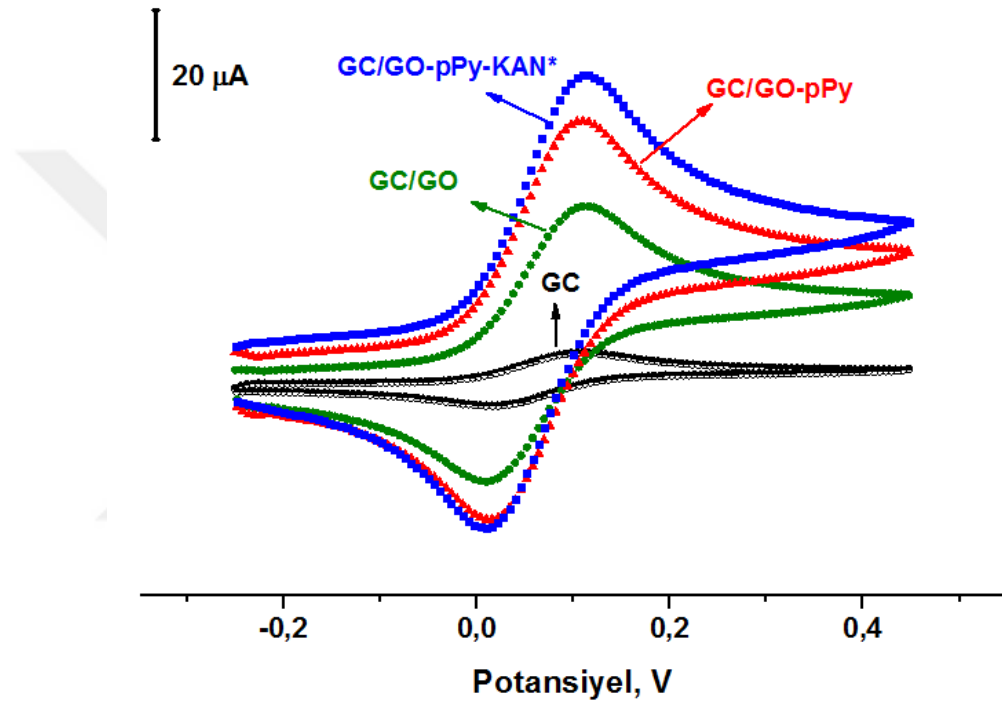


Şekil 4.5. GC/GO-pPy-KAN için XPS spektrumu.



Şekil 4.6. GC/GO-pPy, GC/GO-pPy-KAN ve GC/GO-pPy-KAN* yüzeylerinin N_{1s} dar bölge XPS spektrumları.

GC, GC/GO, GC/GO-pPy ve GC/GO-pPy-KAN* yüzeylerinin elektrokimyasal olarak dönüşümlü voltametri (CV) ile karakterizasyonları Şekil 4.7’de görülmektedir. Redoks probun pik akımı değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Karakterizasyonda 1 mM potasyum ferriyanür/potasyum ferrosiyaniür ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$) redoks prob karışımı (0,1 M KCl içinde) kullanılmıştır. İlgili elektrotlar aşağıdaki bölümde verilen optimum çalışmalara göre hazırlanmıştır.



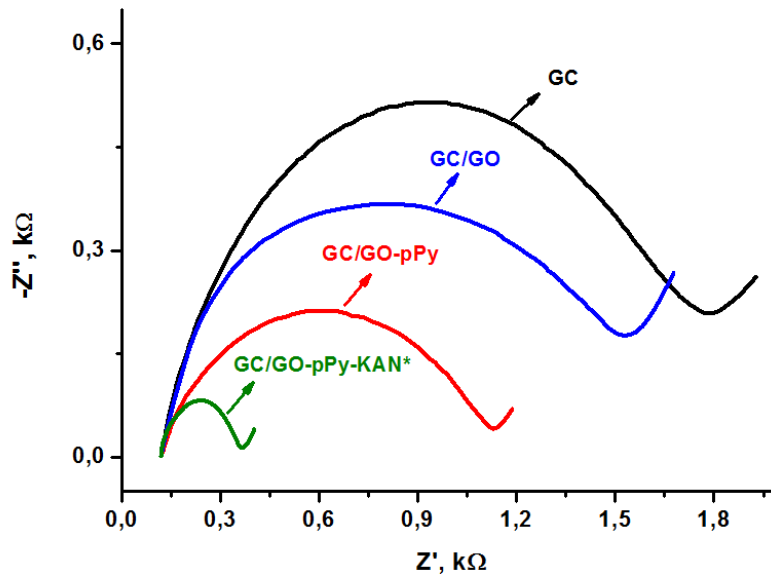
Şekil 4.7. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks probun (0,1 M KCl içinde) GC, GO/GC, GC/GO-pPy ve GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki dönüşümlü voltamogramları (tarama hızı: 200 mV/s; referans elektrot: Ag/AgCl_(doy)).

Çizelge 4.1. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks probun (0,1 M KCl içinde) GC, GO/GC, GC/GO-pPy ve GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki dönüşümlü voltamogramlarından (tarama hızı: 200 mV/s; referans elektrot: Ag/AgCl_(doy)) elde edilen anodik pik akımı değerleri.

Elektrot	Pik akımı, μA
GC	$2,10 \pm 0,12$
GO/GC	$8,92 \pm 0,41$
GC/GO-pPy	$13,56 \pm 1,33$
GC/GO-pPy-KAN*	$14,37 \pm 2,75$

1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks probun (0,1 M KCl içinde) GC, GO/GC, GC/GO-pPy ve GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen anodik pik akımları incelendiğinde, GC/GO-pPy-KAN* elektrot üzerinde redoks probun elektron aktarımının hızlandığı anlaşılmıştır (Erkal et al., 2016). Polimerle birlikte KAN baskılandıktan sonra KAN moleküllerinin sökülmesi sonucu elde edilen GC/GO-pPy-KAN* elektrot üzerinde redoks probun pik akımı $14,37 \mu A$ olarak bulunmuştur. Bu değer, GC/GO-pPy elektrot üzerinde redoks probun anodik pik akımı değeri olan $13,56 \mu A$ 'e oldukça yakındır. GC/GO-pPy-KAN* elektrotun GC/GO-pPy elektrottan en önemli farkı, KAN baskılandıktan sonra tekrar KAN moleküllerinin yüzeyden uzaklaştırılmasıyla yine aynı polimer kaplı elektrotun yüzeyinde boşlukların oluşarak yüzey alanı oldukça fazla bir elektrot yüzeyi elde edilmesidir. Bu yüzey alanı daha büyük olan polimer elektrotun redoks probun pik akımını artırması beklenen bir sonuçtur.

GC, GC/GO, GC/GO-pPy ve GC/GO-pPy-KAN* yüzeylerinin 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çifti karışımı kullanılarak elektrokimyasal impedans spektroskopisiyle (EIS) karakterizasyonları Şekil 4.8'de görülmektedir. İlgili elektrotlar aşağıdaki bölümde verilen optimum çalışmalara göre hazırlanmıştır. Redoks çiftinin yük aktarım dirençleri (R_{ct}) değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Elde edilen Nyquist eğrisinin difüzyon etkili sabit faz elemanlı Warburg elektriksel devre modellemesine uyduğu anlaşılmıştır (Üstündağ ve Solak, 2009).



Şekil 4.8. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin GC, GC/GO, GC/GO-pPy ve GC/GO-pPy-KAN* elektrot üzerindeki Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).

Çizelge 4.2. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks probun (0,1 M KCl içinde) GC, GC/GO, GC/GO-pPy ve GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki EIS ölçümleri sonucu elde edilen Nyquist eğrilerinden elde edilen yük aktarım dirençleri ve eşdeğer elektriksel devre modelleri.

Elektrot	R_{ct} , k Ω	Elektriksel eşdeğer devre
GC	$1,5542 \pm 0,0557$	
GC/GO	$1,3927 \pm 0,0836$	
GC/GO-pPy	$1,0012 \pm 0,0563$	
GC/GO-pPy-KAN*	$0,2413 \pm 0,0048$	

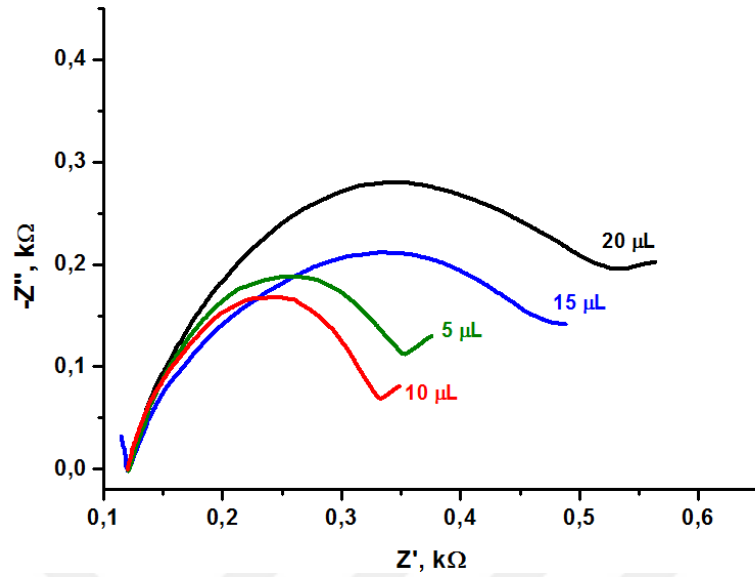
Elektrokimyasal impedans spektroskopisiyle (EIS) elektrot karakterizasyonu sonuçları incelendiğinde redoks prob çiftinin yük aktarım direncinin en düşük olduğu değer 0,2413 k Ω değeriyle GC/GO-pPy-KAN* elektrot üzerinde elde edilmiştir. GC/GO-pPy, GC/GO ve GC elektrotlar üzerinde redoks probun yük aktarım direnci değerleri sırasıyla 1,0012, 1,3927 ve 1,5542 k Ω olarak fit edilmiştir. Redoks probun yük aktarım direncinin en düşük olduğu GC/GO-pPy-KAN* elektrot üzerinde $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'ün elektron aktarım hızının diğer elektrotlara göre oldukça yüksek olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuç, CV ölçümleriyle uyumludur. CV karakterizasyonunda da GC/GO-pPy-KAN* elektrot üzerinde aynı redoks probun elektron aktarımının hızlandığı anlaşılmıştır (Erkal vd., 2016).

4.2. Modifiye Elektrot Üzerinde KAN molekülü İçin Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Sulu ortam numunelerinde KAN tayini için kalibrasyon yöntemi geliştirmeden önce bazı optimizasyon çalışmaları yapılarak aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

4.2.1. GC yüzeyine GO süspansiyonunun damlatılma hacminin belirlenmesi

100 mg GO'den alınarak asetonitril içinde 5 mL süspansiyon hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden alınan 5 µL, 10 µL, 15 µL ve 20 µL çözeltilerin her biri ayrı ayrı GC yüzeyine damlatılarak IR lambası altında 10 dakika bekletmek suretiyle her bir GC yüzeyine GO modifikasyonu sağlanmıştır. Elde edilen GC/GO elektrotlar, KAN içeren pirol çözeltilisiyle modifiye edilerek, KAN molekülleri sökülme suretiyle GC/GO-pPy-KAN* elektrotlara dönüştürülmüştür. Şekil 4.9'da 5 µL, 10 µL, 15 µL ve 20 µL GO süspansiyonu ile hazırlanmış GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerinden 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks probun impedans ölçümleriyle elde edilen Nyquist eğrileri verilmiştir. Nyquist eğrileri Warburg elektriksel devresine göre modellendiğinde redoks probun en düşük yük aktarım direncine 10 µL süspansiyon (100 mg GO/5 mL asetonitril) modifiye edilmiş elektrot üzerinde olduğu anlaşılmıştır. Çizelge 4.3'de 5 µL, 10 µL, 15 µL ve 20 µL GO süspansiyonu ile modifiye edilmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrot üzerinde redoks probun yük aktarım dirençleri verilmiştir. 10 µL GO süspansiyonu ile modifiye edilmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrot üzerinde redoks probun yük aktarım direnci 0,2094 kΩ olarak hesaplanmıştır ve sensör elektrotu olarak kullanılacak olan GC/GO-pPy-KAN* elektrotun elde edilmesi için ideal GO süspansiyon miktarı olan 10 µL belirlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada 25 mM KAN baskılanmış ve 10 dakika 2 M HCl ile muamele sonrası elde edilen GC/GO-pPy-KAN* elektrot yüzeyinde redoks çiftinin EIS çalışmasıyla belirlenmiştir.



Şekil 4.9. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin 5 μ L, 10 μ L, 15 μ L ve 20 μ L GO süspansiyonu kullanılarak hazırlanmış GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).

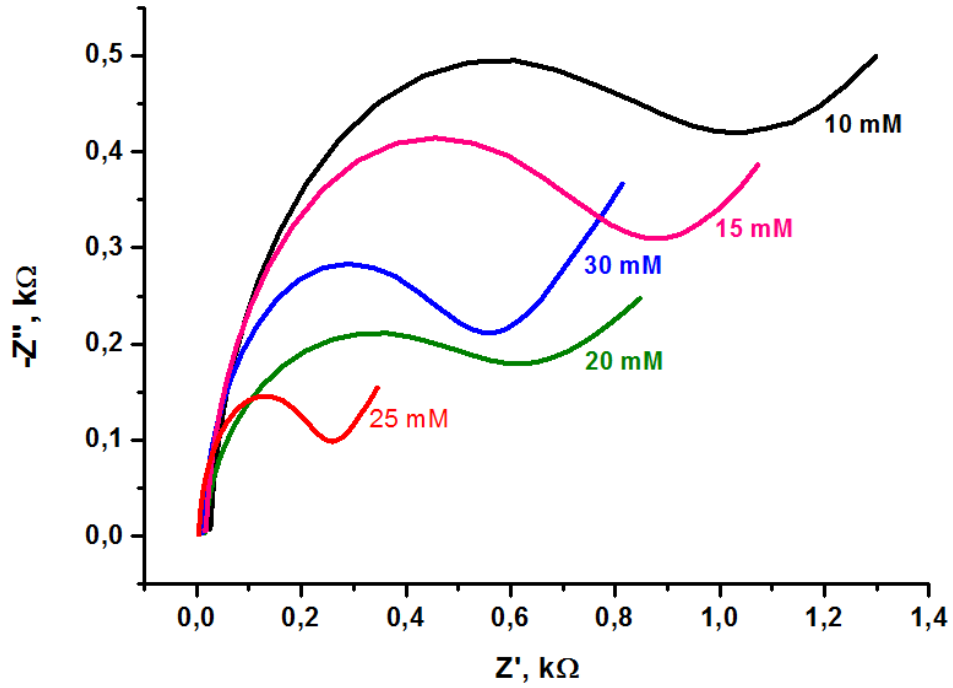
Çizelge 4.3. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin 5 μ L, 10 μ L, 15 μ L ve 20 μ L GO süspansiyonu kullanılarak hazırlanmış GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki Nyquist eğrilerinin Warburg etkili CPE elektriksel devresine göre fit edilmesi sonucu elde edilen Rct değerleri.

GO süspansiyon miktarı, μ L	Rct, k Ω
5	0,2298 \pm 0,0057
10	0,2094 \pm 0,0065
15	0,3391 \pm 0,0112
20	0,3974 \pm 0,0256

4.2.2. 50 mM pirol içine karıştırılarak moleküler baskılanacak KAN konsantrasyonunun belirlenmesi

Sensör elektrotu olarak kullanılacak olan GC/GO-pPy-KAN* elektrotun elde edilmesi için ideal GO süspansiyon miktarı olan 10 μ L belirlendikten sonra baskılanmada kullanılan ideal KAN konsantrasyonunun belirlenmesi için 50 mM pirol (pH=7 PBS tamponuyla hazırlanmış 0,1 M KCl içinde) içine sırasıyla 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM ve 30 mM KAN ilave ettikten sonra GC/GO yüzeyine modifiye edilmiştir. KAN molekülleri 2 M HCl içinde 10 dakika bekletilerek sökülüp ve 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin Nyquist eğrileri alınmıştır (Şekil 4.10). Çizelge 4.4'de 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM ve 30 mM KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN

molekülleri sökülmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki Nyquist eğrilerinin Warburg etkili CPE elektriksel devresine göre fit edilmesi sonucu elde edilen Rct değerleri verilmiştir. Şekil 4.10 ve Çizelge 4.4'den anlaşıldığına göre redoks probun en düşük yük aktarım direnci 25 mM KAN baskılanmış polimerden elde edilen GC/GO-pPy-KAN* elektrottan elde edilmiştir.



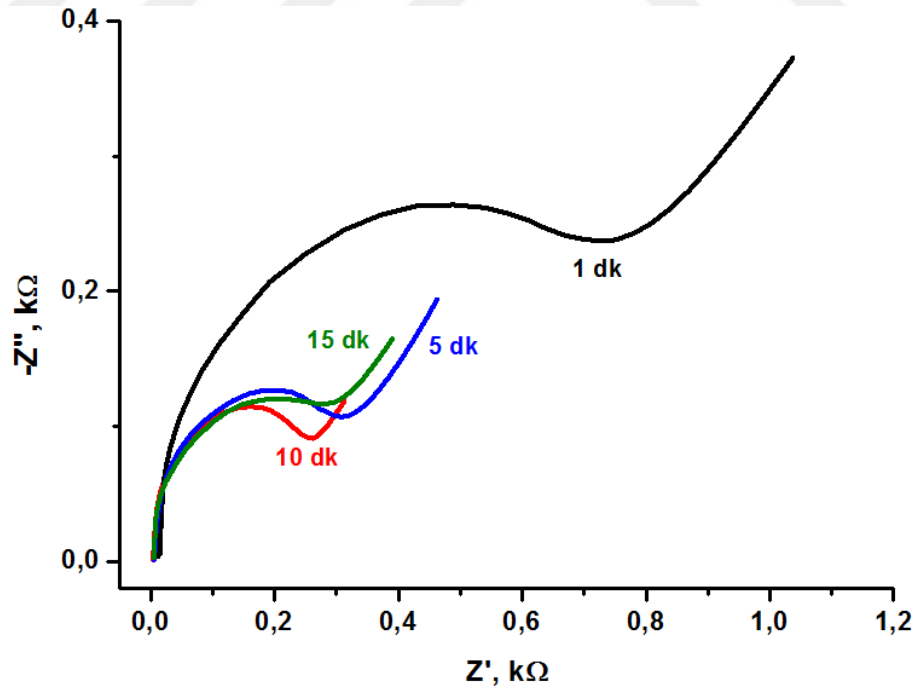
Şekil 4.10. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM ve 30 mM KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN molekülleri sökülmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).

Çizelge 4.4. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM ve 30 mM KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN molekülleri sökülmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki Nyquist eğrilerinin Warburg etkili CPE elektriksel devresine göre fit edilmesi sonucu elde edilen Rct değerleri.

Baskılanan KAN konsantrasyonu, mM	Rct, kΩ
10	0,9564 ± 0,0133
15	0,7737 ± 0,0048
20	0,5815 ± 0,0093
25	0,2325 ± 0,0085
30	0,4831 ± 0,0127

4.2.3.25 mM KAN katkılanmış polipirol modifiye elektrotlardan 2 M HCl içinde KAN'ın sökülerek çıkarılması için gereken ideal sürenin belirlenmesi

10 μ L GO süspansiyonu (100 mg GO/5 mL asetonitril) ile modifiye edilmiş elektrot (GC/GO), 25 mM KAN içeren 50 mM pirol çözeltisi (pH=7 PBS tamponuyla hazırlanmış 0,1 M KCl içinde) ile modifiye edilmiştir. Elde edilen GC/GO-pPy-KAN elektrotu yüzeyindeki KAN molekülleri, 2 M HCl içinde 1 dk, 5 dk, 10 ve 15 dk sürelerle, elektrotlar sabit hızda asit içerisinde sallanmak suretiyle sökülerek çıkarılmaya çalışılmıştır. Çeşitli sürelerde asit çözeltisi içinde muamele edilerek KAN moleküllerinin sökülerek çıkarılmasıyla hazırlanan GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerinde 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin Nyquist eğrileri Şekil 4.11'de verilmiştir. Çizelge 4.5'de ise GC/GO-pPy-KAN elektrotun çeşitli sürelerde 2 M HCl içinde muamele edilmesiyle elde edilen GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerinde redoks probun Nyquist eğrilerinin Warburg etkili CPE elektriksel devresine göre fit edilmesi sonucu elde edilen R_{ct} değerleri verilmiştir. Şekil 4.11 ve Çizelge 4.5'den anlaşıldığına göre redoks probun en düşük yük aktarım direnci, HCl içinde KAN'ın sökülmesi için gereken optimum süre olan 10 dk için elde edilmiştir.



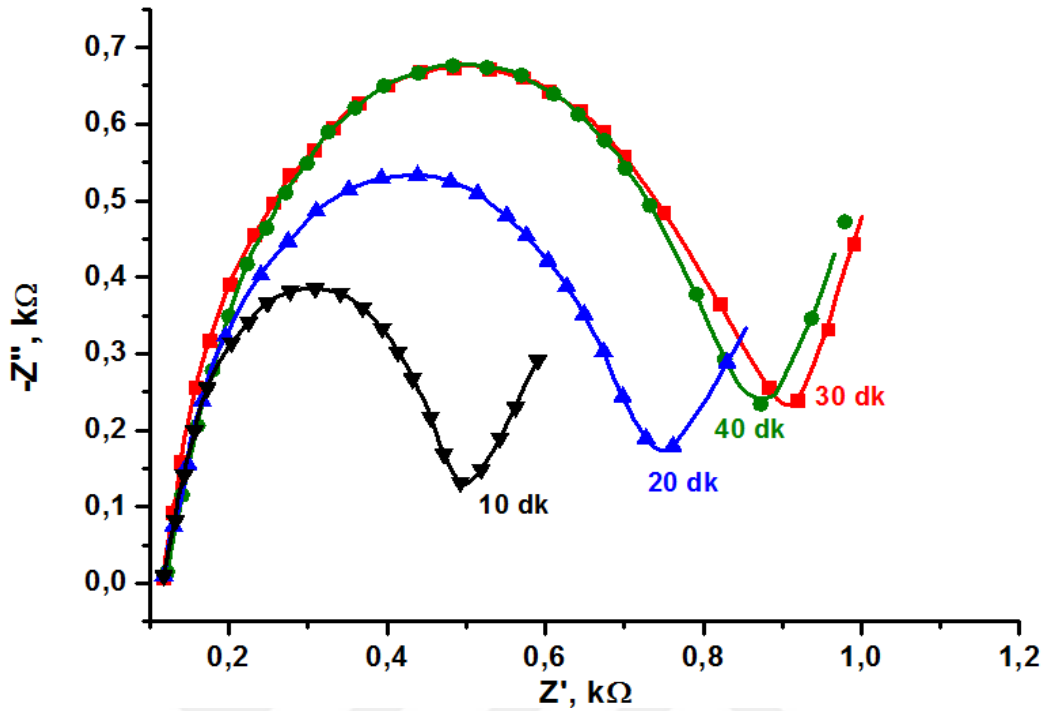
Şekil 4.11. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin; 25 μ M KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN moleküllerinin 2 M HCl ile çeşitli sürelerde sökülmesiyle GC/GO-pPy-KAN* elektrot üzerindeki Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).

Çizelge 4.5. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin; 25 μ M KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN moleküllerinin 2 M HCl ile sökülerek çıkarılma sürelerine karşılık, GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar üzerindeki Nyquist eğrilerinin Warburg etkili CPE elektriksel devresine göre fit edilmesi sonucu elde edilen Rct değerleri.

KAN moleküllerinin sökülme süresi, dk	Rct, k Ω
1	0,6935 \pm 0,0146
5	0,3090 \pm 0,0052
10	0,2485 \pm 0,0048
15	0,2702 \pm 0,0093

4.2.4. GC/GO-pPy-KAN* yüzeyine 1 μ M KAN standardının ideal inkübasyon süresinin belirlenmesi

Önceden belirlenen optimum şartlarda, 1 μ M KAN standardın GC/GO-pPy-KAN* yüzeyindeki boşluklara tutunması için gereken ideal sürenin belirlenmesi için standart numuneler içinde elektrotlar 10 dk, 20 dk, 30 dk ve 40 dk olarak bekletilmiştir Şekil 4.12’de optimum şartlar altında (modifikasyonda kullanılan GO süspansiyonu 10 μ L, moleküler baskılamada kullanılan KAN konsantrasyonu 25 mM, KAN moleküllerinin sökülerek çıkarılma süresi 10 dk) çeşitli sürelerde GC/GO-pPy-KAN* elektrot yüzeyindeki boşluklara 1 μ M KAN (pBS=7 tamponu içinde)’in inkübasyonu ile elde edilen elektrotlarda 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin (pH=7 PBS tamponuyla hazırlanmış 0,1 M KCl içinde) Nyquist eğrileri verilmiştir. Warburg etkili CPE elektriksel devrelerinin modellenmesiyle elde edilen Rct değerleri Çizelge 4.6’da verilmiştir. Çizelgeye göre 30 dakikada elektrotun doyuma ulaştığı anlaşılmış, dolayısıyla bu sürenin yeterli olacağı kanaatine varılmıştır.



Şekil 4.12. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin; 25 μM KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN moleküllerinin 2 M HCl ile 10 dk'da sökülmesiyle elde edilen GC/GO-pPy-KAN* yüzeylerine çeşitli sürelerde 1 μM KAN moleküllerinin inkübasyonu ile elde edilen elektrotlardaki Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).

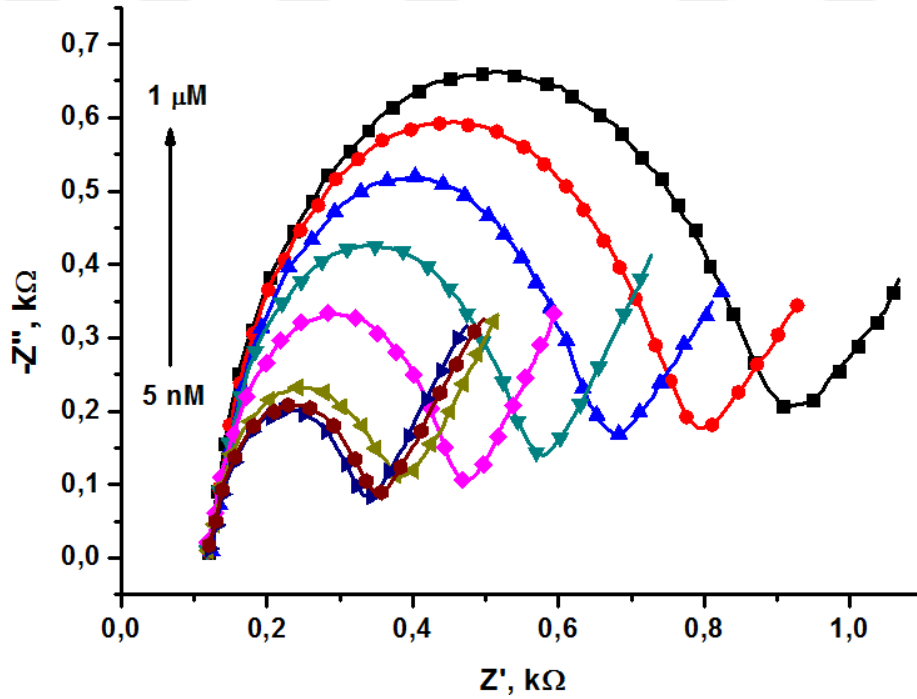
Çizelge 4.6. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin; 25 μM KAN ile baskılanarak polimer elektrot olarak hazırlanan ve sonrasında KAN moleküllerinin 2 M HCl ile 10 dk'da sökülmesiyle elde edilen GC/GO-pPy-KAN* yüzeylerine çeşitli sürelerde μM KAN moleküllerinin inkübasyonu ile elde edilen elektrotlardaki Nyquist eğrilerinden elde edilen yük aktarım direnci değerleri.

KAN moleküllerinin adsorplanma süresi, dk	Ret, k Ω
10	0,3645 \pm 0,0174
20	0,5996 \pm 0,0233
30	0,7695 \pm 0,0285
40	0,7301 \pm 0,0264

4.3. Moleküler Baskılanmış Elektrotla KAN Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Sonuçların değerlendirilmesi

Belirlenen optimum şartlarda sensör çalışmaları için elektrotlar hazırlanmıştır. Bunun için, GC yüzeyine 10 μL GO süspansiyonu (100 mg GO/5 mL asetonitril) damlatılmış ve IR lambası (75 W) altında modifikasyon tamamlanmıştır (GC/GO). 25 mM KAN içeren 50 mM pirol

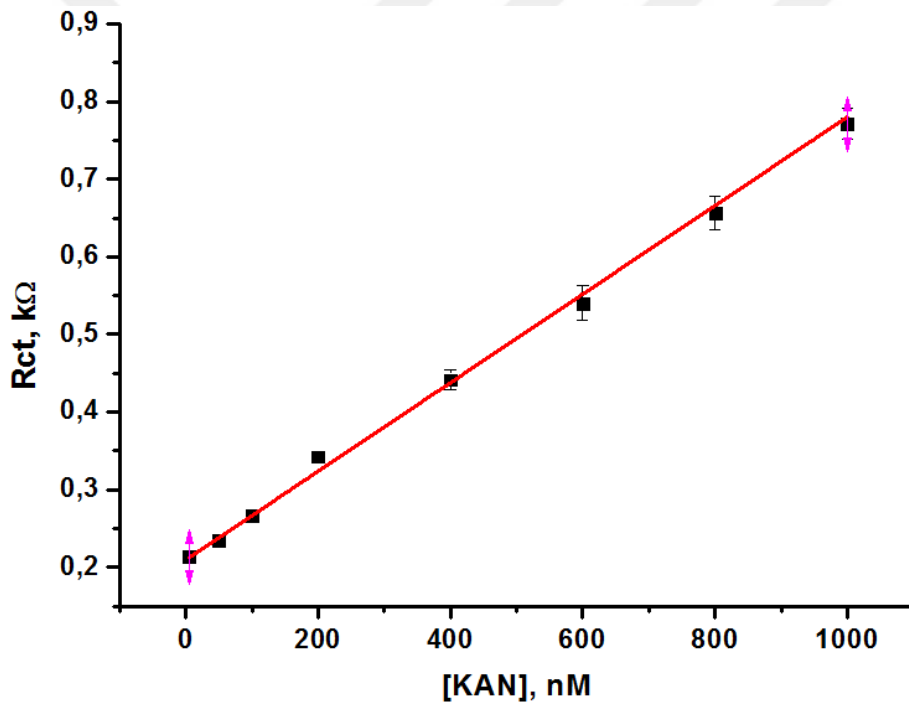
çözeltisi (pH=7 PBS tamponuyla hazırlanmış 0,1 M KCl içinde) ile hazırlanan GC/GO elektrot mofidiye edilmiştir. Elde edilen GC/GO-pPy-KAN elektrotu yüzeyindeki KAN molekülleri, 2 M HCl içinde 10 dakikalık ideal sürede el ile karıştırmak suretiyle sökülerek çıkarılmıştır. Elde edilen GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar kalibrasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Sabit hızda karıştırılan 5 nM-1 μ M aralığında çeşitli standart KAN çözeltileri (pH=7 PBS tamponu) içine GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar daldırılarak optimum süre olan 30 dk bekletilmiştir. Saf su ile yıkanan elektrotlar üzerinde 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin (pH=7 PBS tamponuyla hazırlanmış 0,1 M KCl içinde) Nyquist eğrileri elde edilmek suretiyle impedimetrik ölçümler alınmıştır. Her ölçüm beş defa tekrar edilmiştir. Şekil 4.13'de 5 nM – 1 mM konsantrasyon aralığında KAN ile muamele edilmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrotlar yüzeyinde 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin Nyquist eğrileri verilmiştir. KAN konsantrasyonu değerlerine karşılık elde edilen Nyquist eğrilerinin Warburg etkili CPE elektriksel devre modeliyle fit edilmesi sonucu elde edilen redoks probun yük aktarım direnci değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Redoks probun yük aktarım dirençlerine karşılık KAN konsantrasyonu değişimi kalibrasyon grafiği ise Şekil 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.13. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin; 5 nM-1 μ M KAN ile 30 dk muamele edilmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrot yüzeylerinden elde edilmiş Nyquist eğrileri (DC potansiyeli: 0,05 V; frekans aralığı: 300 kHz-0,2 Hz).

Çizelge 4.7. 5 nM-1 μ M KAN ile muamele edilmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrot yüzeyindeki 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin yük aktarım dirençlerine karşılık KAN konsantrasyonu değişimi tablosu.

[KAN], nM	Rct, k Ω					Rct _{ort} ± SD
	1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	4. ölçüm	5. ölçüm	
5	0,2127	0,2135	0,2118	0,2107	0,2175	0,2132±0,0026
50	0,232	0,2348	0,2441	0,2283	0,2344	0,2347±0,0058
100	0,2685	0,2563	0,2684	0,2728	0,2668	0,2666±0,0062
200	0,3341	0,3408	0,3523	0,3412	0,3427	0,3422±0,0065
400	0,4427	0,4382	0,4253	0,4596	0,4412	0,4414±0,0123
600	0,5671	0,5583	0,5277	0,5146	0,5328	0,5401±0,0219
800	0,6545	0,6487	0,6273	0,6694	0,6842	0,6568±0,0215
1000	0,7775	0,8013	0,7625	0,7641	0,748	0,7707±0,0201



Şekil 4.14. 5 nM-1 μ M KAN ile muamele edilmiş GC/GO-pPy-KAN* elektrot yüzeyindeki 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin yük aktarım dirençlerine karşılık KAN konsantrasyonu değişimi kalibrasyon grafiği.

Elde edilen kalibrasyon grafiği verilerinden impedimetrik KAN tayini için elektroanalitik veriler Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Pct için geliştirilen yöntemin analitik veri analizi ($n=5$).

Analitik karakter	Values
Doğrusal aralık	5 nM-1000 nM
Regresyon eşitliği (Rct: kΩ; [KAN]: nM)	Rct=0,21118+0,00057[KAN]
Eğimin standart hatası, ±	0,00002
Kesim noktasının standart hatası, ±	0,00270
R ²	0,99464
LOD*, nM	5
LOQ, nM	15

* Ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonu LOD olarak kabul edilmiştir.

Literatürde bazı KAN tayinleri incelenmiş olup geliştirilen tayin yöntemiyle diğer KAN tayin sonuçlarının karşılaştırılması Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Literatürdeki bazı KAN tayin yöntemi sonuçları.

Sıra No	Yöntem ve Açıklama	Lineer Konsantrasyon Aralığı	LOD	Referans
1	Aptasensör esaslı / DPV	0,001 nM – 1 µM	0,00016 nM	He ve Yan, 2019
2	Aptamer esaslı / EIS	0,001 nM – 0.1 nM	0,00028 nM	Azadbakht ve Abbasi, 2019
3	Aptamer esaslı / EIS	0,05 µM – 9 µM	9,4 nM	Zhu vd., 2012
4	Aptamer esaslı / Floresan	0,8 nM – 350 nM	0,3 nM	Chen vd., 2015
5	Aptamer esaslı / CA	0,2 nM – 200 nM	0,1 nM	Xin vd., 2015
6	AuNP nanozyme / DPV	0,1 nM – 60 nM	0,06 nM	Wang et al., 2016
7	Moleküler baskılama / DPV	0,1 nM – 1 µM	0,023 nM	Long et al., 2015
8	Moleküler baskılama / EIS	5 nM – 1 µM	5 nM	Bu çalışma

Geliştirilen yöntemin doğruluk ve kesinliği gün içi ve ardışık 5 gün için günler-arası olarak belirlenerek Çizelge 4.10’da verilmiştir. Eklenen KAN değerleri geliştirilen tayin aralığında ara değerler olan 10 ve 100 nM olarak seçilmiştir. Gün içi ve günler-arası doğruluk değerleri %-2,40 ile %+3,20 arasında değişmekte, kesinlik değerleri ise %1,28 ile %3,78 arasında değişmektedir. Genel olarak %5’in altında doğruluk ve kesinlik değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 4.10. Geliştirilen yöntemin doğruluğu ve hassasiyetini belirlemek için yapılan çalışmada birbirinden bağımsız beş seri ile gün içi ve beş ardışık günler arası Pct için DPV ölçüm sonuçlarından elde edilen veriler (N=5).

Eklenen KAN değeri, nM	Gün içi			Günler-arası		
	Bulunan değer, nM	RSD %	Doğruluk k %	Bulunan değer, µM	RSD %	Doğruluk %
10	9,86 ± 0.18	1,83	-1,40	10,12 ± 0.13	1,28	+1,20
100	97,6 ± 3,6	3,69	-2,40	103,2 ± 3,9	3,78	+3,20

Kan molekülleriyle birlikte girişim yapabilecek benzer bazı moleküllerin ve iyonların girişim etkileri, 10 nM KAN ile birlikte denenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.11’de verilmiştir. Girişim grupları olarak 1 μM tobramisin (TOB) ve 1 μM gentamisin (GEN) ve 1 μM penisilin (PEN), 1 amoksisilin 1 μM (AMX), 1 mM Na^+ , 1 mM NH_4^+ seçilmiştir.

Çizelge 4.11. 10 nM KAN için çeşitli moleküllerin ve iyonların varlığında girişim etkileri.

Girişim yapabilecek tür	Konsantrasyon (μM)	% Rct değişimi
TOB	1	-3,12
GEN	1	-2,84
PEN	1	+1,91
AMX	1	-1,70
Na^+	1000	+1,18
NH_4^+	1000	+0,78

Geliştirilen impedimetrik KAN tayin yöntemin performansı gerçek numunelerde üzerinde değerlendirilmiştir. Bunun için çeşme suyu numunesi ve ticari olarak marketlerde bulunan süt numunesi kullanılmıştır. Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Geliştirilen impedimetrik KAN tayin yöntemi ile gerçek numune uygulamalarının analitik sonuçları.

Numune	Eklene n, nM	Bulunan değer, nM	% Geri Kazanım
Su	0	-	-
	50	48,25	96,5
	100	99,37	99,4
	200	204,8	102,8
Süt	0	-	-
	50	48,16	96,3
	100	101,13	101,1
	200	198,7	99,4

Gerçek numune analizi sonuçlarından su ve süt numunelerinde KAN ‘in geri kazanım değerlerinin oldukça iyi olduğu anlaşılmıştır. Her iki numunede geri kazanım değerleri %96,3 ile %102,8 arasında hesaplanmıştır.

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında Kanamisin sülfat standart numunesi kullanılarak impedimetrik KAN tayin yöntemi geliştirilmiştir. KAN, moleküler baskılama yöntemi ile GC/GO elektrot yüzeyine pirol ile birlikte elektrooksidasyon ile polipirol içinde baskılanmıştır. Bu çalışmada elektrot yüzeyine kaplanan GO miktarı 10 [L GO süspansiyonu (100 mg GO/5 mL asetonitril) olarak optimize edilmiştir. Yine baskılanacak KAN miktarı 25 mM olarak seçilmiştir. KAN baskılanmış GC/GO-pPy-KAN elektrot üzerindeki KAN moleküllerinin yüzeyden sökülerek uzaklaştırılması için 2 M HCl kullanılmış ve elektrotun asitle muamele süresi 10 dk olarak optimize edilmiştir.

Hazırlanan GO ve elektrotların yüzey karakterizasyonu için SEM, AFM, XPS gibi çeşitli teknikler kullanılmıştır. Ayrıca hazırlanan GC, GC/GO, GC/GO-pPy, GC/GO-pPy-KAN* elektrotları, elektrokimyasal CV ve EIS teknikleriyle de karakterize edilmiştir.

KAN analizi için kalibrasyon çalışmalarına geçmeden önce kullanılacak GC/GO-pPy-KAN* elektrotu içine biriktirilecek KAN için biriktirme süresi belirlenmiştir. Bunun için optimum şartlarda 1 µM KAN'ın inkübasyon süresi 30 dk olarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon çalışmasında 5 nM-1 µM aralığındaki KAN standartlarının GC/GO-pPy-KAN* elektrota inkübasyonu sonucu oluşan elektrot yüzeyinde 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çiftinin Nyquist eğrileri elde edilerek redoks probun hesaplanan yük aktarım dirençleri (R_{ct}) yardımıyla $R_{ct} - [KAN]$ grafiği çizilmiştir. Elde edilen grafikten $R_{ct}=0,21118+0,00057[KAN]$ kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemin alt tayin sınırı (LOD) 5 nM olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemin doğruluk ve kesinliğinin belirlenmesi için gün içi ve ardışık beş gün için günler-arası olmak üzere 10 ve 100 nM KAN'ın standartlarının analizleri yapılmıştır. Gün içi ve günler-arası doğruluk değeri % -2,40 ile % +3,20 arasında, kesinlik değerleri ise % 1,28 ile % 3,78 arasında hesaplanmıştır. Bu değerler %5'in altında olup kabul edilebilir sınırlar içerisinde. Dolayısıyla yöntemin doğruluğu kesinliği yüksektir. Ardışık beş günlük günler-arası değerlendirmede doğruluğun yüksek olması, bu süre içerisinde elektrot kararlılığının da yüksek olduğu anlamına gelir.

Geliştirilen yöntemin performansını belirlemek için iki farklı gerçek numunede KAN tayini yapılmıştır. Standart ekleme ile 50, 100 ve 200 nM'lık KAN ilavesiyle su ve süt numunelerindeki KAN'ın geri kazanım değerlerinin oldukça yüksek olması (%96,3 ile %102,8 arasında) bu sensörün bu tür gerçek numunelerde kullanılarak KAN tayini yapılabileceğine işaret etmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Adumitrachioaie, A., Tertiş, M., Cernat, A., Sandulescu, R., Cristea, C. (2018). Electrochemical Methods Based on Molecularly Imprinted Polymers for Drug Detection. A Review. *International Journal of Electrochemical Science.*, 13, 2556-2576.

Andersson, L. (2000). Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.*, 745(1), 3-13.

Arshady, R. ve Mosbach, K. (1981). Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Die Makromolekulare Chemie.*, 182, 687-692.

Azadbakht, A. ve Abbasi, A. Z. (2019). Impedimetric aptasensor for kanamycin by using carbon nanotubes modified with MoSe₂ nanoflowers and gold nanoparticles as signal amplifiers. *Microchimica Acta* 186, 23.

Bakhtiar, S., Bhawani, S. A. ve Shafqat, S. R. (2019). Synthesis and characterization of molecular imprinting polymer for the removal of 2-phenylphenol from spiked blood serum and river water. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture.*, 6, 15.

Blanchaert, B., Poderós, J. E., Jankovics, P., Adams, E., Van Schepdael, A. (2013). Assay of Kanamycin A by HPLC with Direct UV Detection. *Chromatographia*, 76, 1505-1512.

Chen, J., Li, Z., Ge, J., Yang, R., Zhang, L., Qu, L. B., Wang, H. Q., Zhang, L. (2015). An aptamer-based signal-on bio-assay for sensitive and selective detection of Kanamycin A by using gold nanoparticles. *Talanta.*, 139, 226-232.

Cheng, C., Liu, S., Xiao, D., Hansel, S. (2010). The Application of Trichloroacetic Acid as an Ion Pairing Reagent in LC-MS-MS Method Development for Highly Polar Aminoglycoside Compounds. *Chromatographia*, 72, 133-139.

Cormack, P. A. G. ve Elorza, A. Z. (2004). Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis And Characterisation. *Journal Chromatography B*, 804, 173-182.

Çelik, K. G., Üzdürmez, A. F., Erkal, A., Kılıç, E., Solak, A. O., Üstündağ, Z. (2016). 3,8-Diaminobenzo[c]cinnoline derivatived graphene oxide modified graphene oxide sensor for the voltammetric determination of Cd²⁺ and Pb²⁺, *Electrocatalysis*, 7, 207-214.

Ensing, K., Berggren, C., Majors, R. E., (2001). Selective Sorbents for Solid-Phase Extraction Based on Molecularly Imprinted Polymers. *LC-GC Europe*, 19(9): 943-954.

Erkal, A., Aşık, İ., Yavuz, S., Kariper, İ. A., Üstündağ, Z. (2016). Biosensor application of carbonaceous nanocoil material: Preparation, characterization, and determination of dopamine and uric acid in the presence of ascorbic acid, *Journal Electroanalytical Chemistry* 163, H269-H277.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Erkal, A., Üstündağ, İ., Yavuz, S., Üstündağ, Z. (2015). An Electrochemical Application of MnO₂ Decorated Graphene Supported Glassy Carbon Ultrasensitive Electrode: Pb²⁺ and Cd²⁺ Analysis of Seawater Samples. *Journal. Electroanalytical Chemistry*, 162, H213-H219.

Goldemberg, J. (1998). What Is the Role of Science in Developing Countries *Science.*, 279, 1140-1141.

Ha, N. R. Jung, I. P., Kim, S. H., Kim, A. R., Yoon, M. Y. (2017a). Paper chip-based colorimetric sensing assay for ultra-sensitive detection of residual kanamycin. *Process Biochemistry*, 62, 161-168.

Ha, N. R. Jung, I. P. La, I. J., Jung, H. S., Yoon, M. Y. (2017b). Ultra-sensitive detection of kanamycin for food safety using a reduced graphene oxide-based fluorescent aptasensor, *Scientific Reports.*, 7, 1–10.

He, B. ve Yan, S. (2019). Voltammetric kanamycin aptasensor based on the use of thionine incorporated into Au@Pt core-shell nanoparticles. *Microchim Acta* 186, 77.

He, H., Hu, Y., Chen, S., Zhuang, L., Ma, B., Wu, Q. (2017). Preparation and Properties of A Hyperbranch-Structured Polyamine adsorbent for Carbon Dioxide Capture. *Scientific Reports*, 7(1).

Hishiyama, T., Asanuma, H. ve Komiyama, M. (2003). Molecularly Imprinted Cyclodextrin Polymers as Stationary Phases of High Performance Liquid Chromatography. *Polymer Journal*, 35(5), 440-445.

Hlabangana, L. ve Memeza, S. (2018). Ion-pair isocratic simultaneous determination of broad spectrum antibiotics in environmental samples by HPLC with UV detection. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 10, 104-111.

Hou, S., Su, S., Kasner, M. L., Shah, P., Patel, K., Madarang, C. J. (2010). Formation of highly stable dispersions of silane-functionalized reduced graphene oxide. *Chemical Physics Letters*, 501, 68-74.

Isoherranen, N. ve Soback, S. (1999). Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics. *Journal of AOAC International*. 82, 1017–1045.

Kariper, İ. A., Çağlayan, M. O., Üstündağ, Z. (2019). Heterogeneous Au/Ru hybrid nanoparticle decorated graphene oxide nanosheet catalyst for the catalytic reduction of nitroaromatics, *Research on Chemical Intermediates*, 45, 801-813.

Kim, S. G., Park, O. K., Lee, J. H., Ku, B. C. (2013). Layer-by-layer assembled graphene oxide films and barrier properties of thermally reduced graphene oxide membranes., 14(4), 247-250.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

King, A. A. K., Davies, B. R., Noorbehesht, N., Newman, P., Church, T. L., Harris, A. T., Razal, J. M., Minett, A. I. (2016). A New Raman Metric for the Characterisation of Graphene oxide and its Derivatives. *Scientific Reports*, 6(1), 19491.

Kitagawa, T., Fujiwara, K., Tomonoh, S., Takahashi, K., Koida, M. (1983). Enzyme immunoassays of kanamycin group antibiotics with high sensitivities using anti-kanamycin as a common antiserum: reasoning and selection of a heterologous enzyme label. *Journal of Biochemistry*, 94(4), 1165-1172.

Kumari, R., Banerjee, T., Anupurba, S. (2018). Molecular detection of drug resistance to ofloxacin and kanamycin in Mycobacterium tuberculosis by using multiplex allele-specific PCR, *Journal of Infection and Public Health*, 11, 54-58.

Lee, J. H., Kim, H. J., Suh, M. W., Ahn, S. C. (2011). Sustained Fos expression is observed in the developing brainstem auditory circuits of kanamycin-treated rats, *Neuroscience Letters*, 505, 98-103.

Lim, C. M., Cho, B. H., Chung, G. S., Son, S.W. (2012). Determination of aminoglycosides in milk by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *The Korean Society of Veterinary Science Health*, 36, 121-130.

Long, F., Zhang, Z., Yang, Z., Zeng, J., Jiang, Y. (2015) Imprinted electrochemical sensor based on magnetic multi-walled carbon nanotube for sensitive determination of kanamycin, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 755, 7-14.

Long, Y. H., Hernandez, M., Kaale, E., Van Schepdael, A., Roets, E., Borrul, F., Calull, M., Hoogmartens, J. (2003). Determination of kanamycin in serum by solid-phase extraction, pre-capillary derivatization and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 784, 255-264.

Manyanga, V. Dhulipalla, R. L., Hoogmartens, J., Adams, E. (2010). Improved liquid chromatographic method with pulsed electrochemical detection for the analysis of kanamycin. *Journal of Chromatography A*, 1217, 3748-3753.

Marty, J. D. ve Mauzac, M. (2005). Molecular imprinting: state of art and perspectives. *Advances in Polymer Science*, 172, 1-35.

Megoulas, N. C. ve Koupparis, M. A. (2005). Direct determination of kanamycin in raw materials, veterinary formulation and culture media using a novel liquid chromatography–evaporative light scattering method. *Analytica Chimica Acta*, 547, 64–72.

Muthusankar, G., Devi, R. K., Gopu, G. (2020). Nitrogen-doped carbon quantum dots embedded Co₃O₄ with multiwall carbon nanotubes: An efficient probe for the simultaneous determination of anticancer and antibiotic drugs. *Biosensors and Bioelectronics*, 150, 111947.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Noor, N. A. M., Kamarudin, S. K., Darus, M., Yunus, N. F. D. M., Idris, M. A. (2018). Photocatalytic Properties and Graphene Oxide Additional Effects in TiO₂. *Solid State Phenomena*, 280, 65-70.

Novoselov, K. S., A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y., Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov (2004). Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films, *Science.*, 306(5696), s.666-669.

Oertel, R., Neumeister, V., Kirch, W. (2004). Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum, *Journal of Chromatography A.*, 1058, 197-201.

Piletska, E. V., Guerreiro, A. R., Whitcombe, M. J. Piletsky, S. A. (2009). Influence of the polymerization conditions on the performance of molecularly imprinted polymers. *Macromolecules*, 42, 4921–4928.

Preu, M., Guyot, D., Petz, M. (1998). Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions. *Journal of Chromatography A*, 818, 95-108.

Pundir, C. S. ve Batra, B. (2015). Determination of β -ODAP by various methods with special emphasis on biosensors: a mini-review. *Process Biochemistry.*, 50, 2078–2087.

Rao, T. P., Daniel, S. ve Gladis, J. M. (2004). Tailored materials for preconcentration or separation of metals by ion-imprinted polymers for solid-phase extraction (II-SPE). *Trends in Analytical Chemistry.*, 23, 28- 35.

Roychoudhury, P., McNeil, B., Harvey, B. (2007). Simultaneous determination of glycerol and clavulanic acid in an antibiotic bioprocess using attenuated total reflectance mid infrared spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, 585, 246-252.

Ruyck, D. H. ve Ridder, D. H. (2007). Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 21, 1511-1520.

Sellergren, B. ve Allender, C. J. (2005). Molecularly imprinted Polymers: A bridge to Advanced Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, 57, 1733- 1741.

Sellergren, B. ve Andersson, L. (1990). Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate analog imprinting strategy. *Journal of Organic Chemistry.*, 55 (10), 3381–3383.

Shea, K. J., Gilman, J. W., Haffner, C. D., Dougherty, T. K. (1986). Diastereomeric Atropisomers of the Tricyclo [9.3.1.03,8] Pentadecane Ring System. Synthesis and Structural Studies. *Journal of the American Chemical Society.*, 108: 4953.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Song, K. M., Cho, M., Jo, H., Min, K., Jeon, S. H., Kim, T., Han, M. S., Ku, J. K., Ban, C. (2011). Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer. *Analytica Biochemistry* 415, 175–181.

Takeuchi, T. ve Haginaka, J. (1999). Separation and Sensing Based on Molecular Recognition Using Molecularly Imprinted Polymers. *Journal of Chromatography B.*,728: 1-20.

Uygun, Z. O. ve Dilgin, Y. (2013). A novel impedimetric sensor based on molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode for trace level determination of chlorpyrifos. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 188, 78-84.

Üstündağ, Z. ve Solak, A. O. (2009). EDTA modified glassy carbon electrode: preparation and characterization, *Electrochimica Acta*, 54, 6426–6432.

Vlatakis, G., Andersson, L. I., Muller, R., Mosbach, K. (1993). Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting. *Nature*, 361, 645-647.

Wang, C., Liu, C., Luo, J., Tian, Y., Zhou, N. (2016). Direct electrochemical detection of kanamycin based on peroxidase-like activity of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta.*,936, 75-82.

Wang, L. ve Peng, J. (2008). LC Analysis of Kanamycin in Human Plasma, by Fluorescence Detection of the 9-Fluorenylmethyl Chloroformate Derivative. *Chromatographia*, 69, 519-522.

Wang, Y., Ma, T., Ma, S., Liu, Y., Tian, Y., Wang, R., Jiang, Y., Hou, D., Wang, J. (2017). Fluorometric determination of the antibiotic kanamycin by aptamer-induced FRET quenching and recovery between MOS2 nanosheets and carbon dots. *Microchim. Acta*, 184, 203–210.

Wang, Y., Zou, M., Han, Y., Zhang, F., Li, J., Zhu, X., (2013). Analysis of the kanamycin in raw milk using the suspension array, *Journal Chemistry*. 2013, 1–4.

Wu, N., Luo, Z., Ge, Y., Guo, P., Du, K., Tang, W., Du, W., Zeng, A., Chang, C., Fu, Q. (2016). A novel surface molecularly imprinted polymer as the solid-phase extraction adsorbent for the selective determination of ampicillinsodium in milk and blood samples. *Journal of Pharmaceutical Analysis.*,6, 157–164.

Wulff, G. (1995). Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates-A Way towards Artificial Antibodies. *Angewandte Chemie International Edition*, 34, 1812-1832.

Wulff, G., Knorr, K. (2002). Stoichiometric Noncovalent interaction in Molecular imprinting. *Bioseparation*, 10: 257-276.

Wulff, G. ve Poll, H. G. (1987). Enzyme analogue built polymers, 23. Influence of the structure of the binding sites on the selectivity for racemic resolution. *Macromolecular Chemistry And Physics.*, 188(4), 741-748.,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wulff, G., Sarhan, A., Sarhan, A. W., Sarhan, H. (1972). Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for the Resolution of Racemates. *Angewandte Chemie International Edition.*, 11, 341-344.

Xin, Y., Li, Z. ve Zhang, Z. (2015). Photoelectrochemical aptasensor for the sensitive and selective detection of kanamycin based on Au nanoparticle functionalized self-doped TiO₂ nanotube arrays. *Chemical Communications.*, 51, 15498-15501.

Xu, W., Wang, Y., Liu, S., Yu, J., Wang, H., Huang, J. (2014). A novel sandwich-type electrochemical aptasensor for sensitive detection of kanamycin based on GR-PANI and PAMAM-Au nanocomposites, *New Journal of Chemistry*, 38, 4931-4937.

Yan, H. ve Row, K. H. (2006). Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *International Journal of Molecular Sciences.*, 7: 155- 178.

Yavuz, S., Erkal, A., Kariper, I.A., Solak, A.O., Jeon, S., Mülazımoğlu, I. E., Üstündağ, Z. (2016). Carbonaceous Materials-12: A novel highly sensitive graphene oxide based carbon electrode: Preparation, characterization and heavy metal analysis in food samples, *Food Analytical Methods.*, 9, 322-331.

Ye, L. ve Mosbach, K. (2001). Polymers Recognizing Biomolecules Based on A Combination of Molecular imprinting and Proximity Scintillation: A New Sensor Concept. *Journal of American Chemical Society.*, 123(12): 2901– 2902.

Yun, M., Choe, J. E., You, J. M., Ahmed, M. S., Lee, K., Üstündağ, Z., Jeon, S. (2015). High catalytic activity of electrochemically reduced graphene compositetoward electrochemical sensing of Orange II, *Food Chemistry*, 169, 114–119.

Zengin, A., Tamer, U., Çaykara, T. (2014). Extremely sensitive sandwich assay of kanamycin using surface-enhanced Raman scattering of 2-mercaptobenzothiazole labeled gold@silver nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 817, 33–41.

Zhang, L., Zhu, C., Chena, C., Zhu, S., Zhou, J., Wang, M., Shang, P. (2018). Determination of kanamycin using a molecularly imprinted SPR sensor. *Food Chemistry*, 266, 170-174.

Zhang, X., Wang, J., Wu, Q., Li, L., Wang, Y., Yang, H. (2019). Determination of Kanamycin by High Performance, *Molecules*, 24, 1902.

Zhong Y. S., Ni, Y. N., Kokot, S. (2012). Application of differential pulse stripping voltammetry and chemometrics for the determination of three antibiotic drugs in food samples. *Chinese Chemical Letters.*, 23, 339-342.

Zhou, Y. X., Yang, W. J., Zhang L. Y., Wang, Z. Y. (2007). Determination of Kanamycin A in Animal Feeds by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Pre-Column Derivatization and Fluorescence Detection, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.*, 30, 1603-1615.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhu, Y., Chandra, P., Song, K. M., Ban, C., Shim, Y. B. (2012). Label-free detection of kanamycin based on the aptamer-functionalized conducting polymer/gold nanocomposite. *Biosensör Bioelectron.*, 36, 29–34.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı: Deniz Işık
Doğum tarihi ve yeri: 25/01/1992-Eskişehir
e-mail: denizisik26@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum	Bölüm	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Dumlupınar Üniversitesi	Fen Bilgisi ve Teknoloji Öğretmenliği	2015
Lise	H. Süleyman Çakır Lisesi	Sayısal	2010

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
2019	Bil Koleji	Fen Bilgisi Öğretmeni
2017	Final Temel Lisesi	Kimya Öğretmeni
2017	Final kişisel gelişim merkezi	Fen Bilgisi Öğretmeni
2016	Atatürk İlköğretim Okulu	Fen Bilgisi Öğretmeni
2016	ESMEK Kursu	Fen Bilgisi Öğretmeni