

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER RESEPTÖRLERİ İLE KOLİN
TESPİTİ İÇİN İMPEDİMETRİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melahat Sevgül BAKAY

Elektronik ve Haberleşme Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Biyomedikal Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

Eylül 2019

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER RESEPTÖRLERİ İLE KOLİN
TESPİTİ İÇİN İMPEDİMETRİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Melahat Sevgül BAKAY
504161409**

Elektronik ve Haberleşme Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Biyomedikal Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İnci ÇİLESİZ
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Feride Şermin UTKU**

Eylül 2019

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 504161409 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Melahat Sevgül BAKAY, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER RESEPTÖRLERİ İLE KOLİN TESPİTİ İÇİN İMPEDİMETRİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. İnci ÇİLESİZ**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Eş Danışman : **Dr. Öğr. Üyesi Feride Şermin UTKU**
Yeditepe Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Neslihan Serap ŞENGÖR**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sedef KENT PINAR
İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Sezen SİVRİKAYA ÖZAK
Düzce Üniversitesi

Teslim Tarihi: 12 Eylül 2019

Savunma Tarihi: 13 Eylül 2019





Sevgili ailem'e,



ÖNSÖZ

Sahip olduğu akademik altyapısı, kültürü ve kıymetli akademisyenleri ile akademik gelişimimde büyük katkısı olan İstanbul Teknik Üniversitesi'nde yürüttüğüm tez çalışmam süresince güler yüzü ve hoşgörüsü ile beni destekleyen, derin bilgi ve tecrübesiyle çalışmama yön veren değerli danışman hocam Prof. Dr. İnci ÇİLESİZ'e ve eş danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Feride Şermin UTKU'ya, çalışmamız süresince desteğini ve yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Adil DENİZLİ ve ekibine, bu dönemde hiçbir yardımdan kaçınmayıp beni sürekli destekleyen, her türlü yardım ve toleransı gösteren arkadaşlarıma, özellikle Dr. Öğr. Üyesi Sezen SİVRİKAYA, Dr. Öğr. Üyesi İkrime ORKAN UÇAR, Arş. Gör. Sümeyye ARIKAN ve Arş. Gör. Ümit AĞBULUT'a, Beyza GÖLGE ve sevgili ailesine, ve son olarak manevi desteğini hayatım boyunca hissettiğim sevgili annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2019

Melahat Sevgül BAKAY
(Biyomedikal Mühendisi)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xix
ÖZET.....	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. BİYOSENSÖRLER	3
2.1 Biyosensörlerin Kullanım Alanları	3
2.2 Biyosensörlerin Taşınması Gereken Temel Özellikler	4
2.3 Biyosensörlerin Algılayıcılar ve Dönüştürücülerden Oluşan Yapısı	6
3. ELEKTROKİMYASAL ÖLÇÜM.....	9
3.1 Elektrokimyasal Analizde Kullanılan Elektrotlar	9
3.1.1 Referans elektrot	10
3.1.2 Çalışma elektrotları	11
3.1.2.1 Karbon elektrotlar	11
3.1.2.2 Cıva elektrotlar.....	12
3.1.2.3 Diğer elektrotlar	12
3.1.3 Yardımcı elektrot	13
3.2 Dönüşümlü Voltametri (CV).....	13
3.3 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS).....	16
3.3.1 Sonuçların yorumlanması	17
3.3.2 Eşdeğer devre	20
3.3.2.1 Elektrolit direnci.....	21
3.3.2.2 Çift katman kapasitansı	22
4. MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ	23
4.1 Moleküler Baskılı Polimerlerin Temel Kompozisyonu	26
4.1.1 Şablon.....	26
4.1.2 Fonksiyonel monomer.....	26
4.1.3 Çapraz bağlayıcı madde	28
4.1.4 Porojen	28
4.1.5 Başlatıcı.....	29
4.2 Moleküler Baskılama Teknikleri.....	29
4.2.1 Yığın baskılama	29
4.2.2 Yüzey baskılama	30
4.2.2.1 Yumuşak litografi	30
4.2.2.2 Şablon immobilizasyonu.....	31
4.2.2.3 Aşılama yoluyla yüzey baskılama.....	31

4.2.2.4 Emülsiyon polimerizasyonu	31
4.2.3 Epitop baskılama	31
4.3 Yük Transfer Direnci	32
5. İMPEDİMETRİK BİYOSENSÖR UYGULAMALARINA AİT LİTERATÜR	
ÖZETİ	33
5.1 Küçük Moleküllerin İmpedimetrik Biyosensör Kullanılarak Tespiti	38
5.2 Küçük Molekül Olarak Kolin Kullanımının Önemi	40
6. GEREÇ VE YÖNTEM	43
6.1 Kullanılan Cihazlar	43
6.2 Kullanılan Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanmaları	43
6.2.1 Asetik tampon çözeltisi (ABS)	43
6.2.2 Fosfat tampon çözeltisi (PBS)	43
6.2.3 Farklı molaritelerde kolin çözeltileri	44
6.2.4 Kan örneğinin hazırlanması	44
6.3 Deney Düzeneginin ve Elektrotların Hazırlanması	45
6.3.1 Deney düzenegi	45
6.3.2 Elektrotların hazırlanması	46
6.4 Kaplamanın AFM Kullanılarak Karakterizasyonu	48
6.5 Kullanılan Yöntem	48
7. SONUÇ	53
7.1 Kalem Grafit Elektrotların Yüzey Karakterizasyonu	54
7.2 Elektrotların RdxPBS İçinde Analizi	57
7.2.1 Kontrol grubu	57
7.2.1.1 Negatif kontrol grubu	57
7.2.1.2 Pozitif kontrol grubu	60
7.2.2 Deneysel gruplar	62
7.3 Elektrotların Spesifisite Analizleri	71
7.4 Elektrotların Kan Serumunda Analizi	74
8. TARTIŞMA	79
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	93

KISALTMALAR

AA	: Akrilik Asit
ABVN	: 2,2'-Azobis (2,4-Dimetilvaleronitril)
ABS	: Asetik Tampon Çözeltisi
AC	: Alternatif Akım
AChE	: Asetilkolinesteraz Enzimi
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
AIBN	: 2,2'-Azobis (İzobütronitril)
AMBN	: 2-Metilizobütronitril
C_{dl}	: Çift Katman Kapasitansı
cm²	: Santimetrekare
CPE	: Karbon Partası Elektrodu
CPF	: Klorpirifoz
CV	: Dönüşümsel Voltametri
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DR	: Dinamik Aralık
DÜBİT	:Düzce Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi
DVB	: Divinilbenzen
EBMAA	: N,N-Etilenbimetakrilamit
EC	: Elektrokimyasal Hücre
EGDMA	: Etilen Glikol Dimetakrilat
EIS	: Elektroempedans Spektroskopisi
ELISA	: Enzim Bağlantılı Bağışıklık Testi
ESI	: Elektrospray İyonlaşması
FET	: Alan Etkili Transistör
fg	: Femtogram
fmol	: Femtomol
HEMA	: 2-Hidroksimetilmetakrilat
i_c	: Kapasitif Akım
IDE	: Birbirine Bağlı Elektrotlar

ir	: Faradayik Akım
is	: Sınır Akımı
ISFET	: İyon Duyarlı Alan Etkili Transistör
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
kHz	: Kilohertz
kΩ	: Kiloohm
LOC	: Çip Üstü Laboratuvar
M	: Molar
MAA	: Metakrilik Asit
MAGA	: Metakriloamidoglutamik Asit
mg	: Miligram
MIP	: Moleküler Baskılanmış Polimer
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
mm²	: Milimetrekare
MS	: Kütle Spektrometresi
mV	: Milivolt
n	: Tepkimelerde Transfer Edilen Elektron Sayısı
ng	: Nanogram
nM	: Nano Molar
OCP	: Açık Hücre Potansiyeli
PBMP	: 2-Metil-2-Propenamit
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi
PDMS	: Polidimetilsiloksan
pg	: Pikogram
PGE	: Kalem Grafit Elektrot
pH	: Hidrojenin Gücü
PMMA	: Polimetilmetakrilat
pmol	: Pikomol
POC	: Bakım Noktası
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
rad	: Radyan
R_{ct}	: Yük Transfer Direnci
R_s	: Çözelti Direnci

sat	: Doymuş
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
SHE	: Standart Hidrojen Elektrot
sn	: Saniye
SPCE	: Serigrafi Baskılı Karbon Elektrot
SPE	: Serigrafi Baskılı Elektrot
TRIM	: Trimetilolpropan Trimetakrilat
UV	: Ultraviyole
VP	: Vinilpridin
V_{p-p}	: Tepeden Tepeye Gerilim Değeri
VCAM	: Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü
Z_{im}	: Sanal Empedans
Z_r	: Gerçek Empedans
Z_w	: Warburg Empedansı
X_c	: Kapasitör Empedansı
XPS	: X ışını Fotoelektron Mikroskopu
3D	: 3 Boyutlu
[O]	: Yükseltgenen Maddenin Derişimi
[R]	: İndirgenen Maddenin Derişimi
µA	: Mikroamper
µF	: Mikrofarad
µg	: Mikrogram
µm²	: Mikrometrekare



SEMBOLLER

A	: Amper
Ag/AgCl	: Gümüş/Gümüş Klorür
C₂H₃NaO₂*3H₂O	: Sodyum Asetat Trihidrat
Cl	: Klor
E_{1/2}	: Yarı Dalga Potansiyeli
f	: Frekans
F	: Faraday Sabiti
FeCN₆	: Hekzasiyanoferrat(II)
HCl	: Hidroklorik Asit
Hg	: Civa
Hg₂Cl₂	: Civa(I) Klorür
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
Hz	: Hertz
I	: Akım
K₃[FeCN₆]	: Potasyum Hekzasiyanoferrat(III)
KCl	: Potasyum Klorür
KH₂PO₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
log	: Logaritma
NaCl	: Sodyum Klorür
Na₂HPO₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
R	: Gaz Sabiti
t	: Zaman
V	: Volt
Y	: Admitans
Z	: Empedans
μ	: Mikro
Ω	: Ohm
Φ	: Faz Açısı
°C	: Santigrad Derece



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Dönüştürücü çeşitleri ve çalışma prensipleri [15].	7
Çizelge 3.1: Empedans davranışını açıklamak için kullanılan elemanlar, tanımlamaları, faz açıları ve frekansa bağımlılıkları [32].	20
Çizelge 4.1: Kovalent olmayan baskılama için ortak fonksiyonel monomerler [43].	27
Çizelge 4.2: Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlanma monomerleri [44].	28
Çizelge 4.3: Moleküler baskılama için yaygın olarak kullanılan başlatıcılar [46].	29
Çizelge 6.1: Çözeltiye eklenen kolin derişimleri ve isimlendirilmesi.	44
Çizelge 7.1: Negatif kontrol grubu elektrodunun EIS verileri.	58
Çizelge 7.2: Pozitif kontrol grubu elektrodunun EIS verileri.	60
Çizelge 7.3: 2E-1ChMPGE elektrodunun EIS verileri.	64
Çizelge 7.4: 5E-1ChMPGE elektrodunun EIS verileri.	66
Çizelge 7.5: 10E-1ChMPGE elektrodunun EIS verileri.	68
Çizelge 7.6: 20E-1ChMPGE elektrodunun EIS verileri.	70
Çizelge 7.7: 2E-1ChMPGE elektrodunun TRIS çözeltisindeki EIS verileri.	73
Çizelge 7.8: 5E-1ChMPGE elektrodunun TRIS çözeltisindeki EIS verileri.	73
Çizelge 7.9: 2E-1ChMPGE elektrodunun kan serumundaki EIS verileri.	75
Çizelge 7.10: 5E-1ChMPGE elektrodunun kan serumundaki EIS verileri.	77
Çizelge 8.1: Elektrotların regresyon analizlerinin ve tayin aralıklarının karşılaştırılması.	82
Çizelge 8.2: Kolin tayini için yöntem ve tayin aralıklarının özeti.	83



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Biyosensörlerin yapısı [13,14].	7
Şekil 3.1: Üçlü elektrot sistemi.	10
Şekil 3.2: Dönüşümlü Voltamogram	14
Şekil 3.3: Empedansın potansiyel ve akıma bağlı olarak gösterimi.	17
Şekil 3.4: Nyquist diyagramı ve eşdeğer devresi [28].	18
Şekil 3.5: Açısız frekansın bir fonksiyonu olarak elektrokimyasal bir sisteminin empedansını (modül ve faz açısı) gösteren Bode diyagramı [31].	20
Şekil 3.6: Randles eşdeğer devre modeli.	21
Şekil 4.1: Moleküler baskılama yöntemi [37].	25
Şekil 4.2: Moleküler kovalent ve kovalent olmayan baskılama sürecinin şematik gösterimi [40].	26
Şekil 4.3: Yumuşak litografi ve UV polimerizasyonu ile MIP filmlerin üretim sürecinin şematik gösterimi [54].	31
Şekil 5.1: Kolinin Yapısal Formülü [82].	40
Şekil 6.1: Deney düzeneği.	46
Şekil 6.2: 60 sn boyunca +1.4 V sabit gerilimde ABS içinde anodize edilmiş PGE'ler için ortalama akım-zaman eğrileri.	46
Şekil 6.3: Moleküler baskılama süreci.	47
Şekil 6.4: Grafit elektrotların PBS çözeltisi içinde görünümü.	49
Şekil 6.5: Standart katma metodu.	50
Şekil 7.1: Kaplama yapılmayan elektrodun AFM görüntüsü.	55
Şekil 7.2: 2E-1ChMPGE elektrodun AFM görüntüsü.	55
Şekil 7.3: 5E-1ChMPGE elektrodunun AFM görüntüsü.	56
Şekil 7.4: 10E-1ChMPGE elektrodunun AFM görüntüsü.	56
Şekil 7.5: 20E-1ChMPGE elektrodunun AFM görüntüsü.	57
Şekil 7.6: Negatif kontrol grubu elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.	59
Şekil 7.7: Negatif kontrol grubu elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.	59
Şekil 7.8: Pozitif kontrol grubu elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.	61
Şekil 7.9: Pozitif kontrol grubu elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.	61
Şekil 7.10: 2E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.	63
Şekil 7.11: 2E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.	63
Şekil 7.12: 2E-1ChMPGE elektrodunun kalibrasyon eğrisi.	64
Şekil 7.13: 5E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.	65

Şekil 7.14: 5E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.	65
Şekil 7.15: 5E-1ChMPGE elektrodunun kalibrasyon eğrisi.	66
Şekil 7.16: 10E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.	67
Şekil 7.17: 10E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.	67
Şekil 7.18: 10E-1ChMPGE elektrodunun kalibrasyon eğrisi.	68
Şekil 7.19: 20E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.	69
Şekil 7.20: 20E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.	69
Şekil 7.21: 20E-1ChMPGE elektrodunun kalibrasyon eğrisi.	70
Şekil 7.22: 2E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde TRIS içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.	72
Şekil 7.23: 5E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde TRIS içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.	72
Şekil 7.24: 2E-1ChMPGE elektrodunun TRIS çözeltisinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.	73
Şekil 7.25: 5E-1ChMPGE elektrodunun TRIS çözeltisinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.	74
Şekil 7.26: 2E-1ChMPGE elektrodunun seyreltilmiş kan serumundaki EIS sonucu.	75
Şekil 7.27: 2E-1ChMPGE elektrodunun kan serumundan elde edilen kalibrasyon eğrisi.	76
Şekil 7.28: 5E-1ChMPGE elektrodunun seyreltilmiş kan serumundaki EIS sonucu.	76
Şekil 7.29: 5E-1ChMPGE elektrodunun kan serumundan elde edilen kalibrasyon eğrisi.	77
Şekil 8.1: E-5ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu [78].	80
Şekil 8.2: E-3ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu [78].	81
Şekil 8.3: E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu [78].	81

MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER RESEPTÖRLERİ İLE KOLİN TESPİTİ İÇİN İMPEDİMETRİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile elektrot-elektrolit arayüzeyinin ve analizi yapılacak moleküllerin bağlanma kinetiklerinin ölçümü yapılmaktadır. Elektrokimyasal teknikler içinde EIS, moleküler etkileşimlerin elektrokimyasal analizlerinde, sensör ve biyosensör teknolojisinin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. EIS, özellikle afinite temelli biyosensör ve sensör uygulamalarında bağlanma bölgeleri ile sinyal iletim sistemlerinin birbirine bağlanmasında avantaj sağlayan bir yöntemdir. Ayrıca EIS yöntemi; kolay uygulanabilirlik, hassas ölçüm yapabilme kabiliyeti ve düşük maliyeti ile elektroanalitik analizlerde de sıklıkla tercih edilmektedir. EIS yöntemi kullanılarak yapılan analizlerde genellikle ikili ya da üçlü elektrot sistemi kullanılmaktadır. Bu çalışmada, elektrokimyasal analizde, çalışma elektrodu (kalem grafit elektrot (PGE)), yardımcı elektrot (platin tel) ve referans elektrottan (Ag/AgCl) oluşan üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrot kullanılması, yüksek elektrokimyasal aktivitesi, düşük maliyeti ve tekrar üretilebilir elektrot yüzeylerinin olması, kolay ulaşılabilmesi ve mekanik sertliğinin de iyi olması gibi avantajlarından dolayı diğer elektrotlara üstünlük sağlamaktadır. Bu avantajlar kalem grafit elektrotların birçok elektroanalitik çalışmada kullanımını yaygın hale getirmiştir. Bu çalışmada empedans bazlı ölçümlerin seçiciliğini ve spesifikliğini sağlamak amacıyla kalem grafit elektrotlar ve moleküler baskılama yöntemiyle düşük maliyetli, kolaylıkla kullanılabilen, kolin molekülünün hassas ve seçici olarak belirlenmesine yönelik elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Kalem grafit elektrot üzerine moleküler baskılama yöntemiyle kolin baskılanmış olup, daha sonra kolin molekülleri elektrot yüzeyinden uzaklaştırılarak sadece kolin molekülünün bağlanabileceği kolin tanıma bölgeleri oluşturulmuştur. Yüzeyinde farklı miktarlarda kolin boşluğu olan çalışma elektrotlarının, farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerde dönüşümsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans ölçümlerinin (EIS) analizi yapılmış, çözeltilerin değişen kolin derişimine karşı verdiği akım, gerilim ve empedans yanıtları incelenmiştir. CV ve EIS, elektrot yüzeyinde meydana gelen değişikliklerin ve etkileşimlerin tespit edilmesinde kullanılan, oldukça hassas ölçüm yöntemleridir. CV yöntemi kullanılarak -500/+500 mV arasında değişen gerilim değerine karşı değişen akım yanıtları incelenirken, EIS yöntemiyle empedansta meydana gelen değişimler incelenmektedir.

Bu çalışmada asetik tampon çözeltisi (ABS) içerisinde optimizasyonu yapılan elektrotlar kullanılmıştır. Daha sonra elektrotlar negatif ve pozitif kontrol grubu da dahil olmak üzere toplam altı farklı elektrot grubuna ayrılarak, deneysel elektrotların üzerine dört farklı kolin derişiminde moleküler baskılama yapılmıştır. Elektrotların 5 mM $[K_3Fe(CN)_6]^{-3/4}$ redoks çifti içeren fosfat tampon çözeltisi (PBS) içindeki davranışı CV ve EIS yöntemleriyle altı farklı kolin derişiminde karakterize edilmiştir. PBS çözeltisinde yapılan ölçümlerin sonucunda, kolin derişimindeki

artışla birlikte artan miktarda moleköl elektrot yüzeyine tutunacağından, empedansta da beklendiği gibi bir artış görülmüştür. Dört farklı derişimde kolin baskılanan elektrotların tayin aralıkları altı farklı derişimde kolin içeren PBS çözeltisinde tespit edilerek yapılan regresyon analizine göre en optimum sonucu veren elektrotlar belirlenerek, bu elektrotların seçicilik ve spesifisitesi incelenmiştir. Elektrotların koline özgünlüğünü tespit etmek amacıyla, yakın yapıdaki TRIS molekölü kullanılarak spesifisite analizi gerçekleştirilmiştir. Altı farklı kolin derişiminde yapılan analizlerdeki derişimlerle aynı derişime sahip TRIS çözeltileri hazırlanarak PBS içinde elektrotların ölçümleri yapılmıştır. Yapılan spesifisite analizi sonucunda, kolin baskılanarak hazırlanan elektrotların koline özgü çalıştığı gösterilmiştir.

Elektrotların kan serumunda bulunan kolin miktarının tespitinde kullanılabilirliği standart katma metodu yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu metotta amaç, örneğe eklenen, sabit hacimde ve derişimi bilinmeyen analite karşı değişen miktarlarda ve derişimi bilinen standardın eklenerek enstrüman yanıtında meydana gelen derişiminin saptanması ve bu derişim baz alınarak analitin derişiminin hesaplanmasıdır. Örneğe, sabit miktarda (0.5 mL) serum eklenmesine karşı değişen miktarda (5, 10, 15 ve 20 mL) ve derişimi bilinen standart eklenerek ve toplam hacim PBS ile 30 mL'ye tamamlanarak analiz yapılmıştır. EIS grafiğinden elde edilen empedans verilerine göre yapılan regresyon analizi ve hesaplamalara göre kandaki kolin miktarının $10.64 \pm 0.546 \mu\text{M}$ olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasının sonucu olarak kan serumunda kolin tespitinde en başarılı yanıt 2E-1ChMPGE elektrodunun verdiği görülmüştür. 2E-1ChMPGE elektrodunun tayin aralığı 71.6 pM-7.16 μM , tayin sınırı da 71.6 pM olarak tespit edilmiştir.

DEVELOPMENT OF AN IMPEDIMETRIC BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF CHOLINE USING MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER RECEPTORS

SUMMARY

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is used to measure the electrode-electrolyte interface and the binding kinetics of the molecules to be analyzed. In electrochemical techniques, EIS has been widely used in the electrochemical analysis of molecular interactions and in the development of sensor and biosensor technology. EIS is an advantageous method of connecting signal transduction systems with binding sites, especially in affinity-based biosensors and sensor applications. In addition, the EIS method is preferred in electroanalytical analyzes because of its easy applicability, precise measurement capability, and low cost. Analyzes, where the EIS method is utilized are usually carried out in two or three-electrode systems. In this study, in the EIS analysis, a three-electrode system consisting of a working electrode (pencil graphite electrode (PGE)), a counter electrode (platinum wire) and a reference electrode (Ag/AgCl) was used. The pencil graphite electrode as the working electrode is superior to other carbon-based electrodes due to its advantages such as high electrochemical activity, low cost and reproducibility of electrode surfaces, ease of accessibility and good mechanical rigidity. These advantages have made the use of pencil graphite electrodes widespread in many electroanalytical studies. In this study, electrochemical biosensor has been developed with low cost and easily usable for the determination of choline molecule by using pencil graphite electrodes and molecular imprinting (MIP) method in order to provide highly selective and specific impedance-based measurements. Choline was imprinted on the graphite electrode surface by molecular imprinting method. Then these choline molecules as a template molecule were removed from the electrode surface and choline recognition sites were formed which could only bind the choline molecule. Working electrodes with different amounts of choline recognition sites on the surface were analyzed in choline-containing solutions at different choline concentrations. Their current, voltage and impedance responses to the changing choline concentration of the solution were investigated on cyclic voltammetry (CV) and EIS methods. CV and EIS are highly sensitive and accurate methods which are used to detect changes and interactions on the electrode surface. In this study, the changes in impedance are examined by EIS method while changing current responses with varying voltage values between -500/+500 mV are examined by CV method.

In this study, electrodes optimized in acetic buffer solution (ABS) were used. The electrodes were then divided into a total of six different electrode groups, including the negative and positive control groups, and molecular imprinting was applied on the experimental electrodes at four different choline concentrations which were named as 2E-1ChMPGE, 5E-1ChMPGE, 10E-1ChMPGE and 20E-1ChMPGE according to imprinted concentrations. The behavior of the electrodes in phosphate buffer solution (PBS) containing 5 mM $[K_3Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ redox pairs was

characterized by CV and EIS methods at six different choline concentrations which were E-11 M, E-10 M, E-9 M, E-8 M, E-7 M and E-6 M. As a result of the measurements made in the PBS solution, an increase in the impedance was observed as expected due to the increasing amount of choline concentration attached to the electrode surface. When the choline sites on the electrode surface also increase with increasing imprinted choline concentration, more choline can be attached to these sites since choline-binding properties are affected. Thus, the diameter of the semicircle of the Nyquist diagram, R_{ct} , increases due to choline adsorption to the electrodes. As a result of regression analysis based on impedance values, 2E-1ChMPGE, 5E-1ChMPGE, 10E-1ChMPGE and 20E-1ChMPGE electrodes success choline detection in the rate of 97.96%, 97.98%, 96.88% and 91.99%, respectively. The detection range (DR) of four different concentrations of choline imprinted electrodes were determined in PBS solution containing six different concentrations of choline. The electrodes giving most optimum results were determined according to the regression analysis, and the selectivity and specificity of these electrodes were examined. In order to determine the specificity of the electrodes to choline, specificity analysis was performed using the TRIS molecule having a similar structure.

In order to show that the responses of the electrodes were specific to choline, specificity analysis was performed to investigate the responses to the different molecule. The specificity of choline imprinted pencil graphite electrodes was conducted on TRIS (hydroxymethyl) aminomethane molecule to show that the electrodes made a choline specific detection. For analysis, the PBS solutions of TRIS were prepared. Then, the electrodes were analyzed in PBS containing TRIS solutions as the same concentrations with six different choline concentrations. As a result of the EIS responses, it is seen that impedance and R_{ct} values decrease in the increasing number of moles of TRIS in PBS. This demonstrates that the added TRIS does not bind to the choline sites on the electrode surface and stands in the solution. In this way, the conductivity of the solution increased. It has been found that with increasing solution conductivity, the current flow increases and thus the impedance decreases as expected. In consequence, a successful specificity analysis was performed in 95.21% for 2E-1ChMPGE and 94.54% for 5E-1ChMPGE electrodes.

The usability of the electrodes in determining the amount of choline in the blood serum was conducted by using the standard addition method. This method is preferred as the calibration method for the determination of an analyte whose concentration is unknown in complex matrices such as biological liquids, soil samples, etc. The signal obtained from the analyte may be blocked by other components present in the complex matrix and error can occur while the determination of analyte concentration. Standard addition method can overcome this problem to a great extent. The main purpose of this method is to insert analyte and standard to the sample and observe changes in instrument response which is impedance for this thesis. It is assumed that the variety in impedance response between the analyte sample and sample results only from the change in analyte concentration. The standard addition method was performed by adding a constant amount (0.5 mL) of serum versus a varying amount (5, 10, 15 and 20 mL) and the known concentration of the standard. And PBS was added until the total sample volume was 30 mL. The EIS results for the 2E-1ChMPGE and 5E-1ChMPGE electrodes show the correlation between increased choline concentration and impedance which indicate the binding of choline. In accordance with EIS graphs of 2E-1ChMPGE and 5E-1ChMPGE electrodes, it is seen that impedance and R_{ct}

values increase regularly. According to the regression analysis and calculations made based on the impedance data obtained from the EIS graph, the amount of choline in the blood was found to be $10.64 \pm 0.546 \mu\text{M}$. In the standard addition method, the analysis was completed 98,32% success rate for 2E-1ChMPGE and 94,12% success rate for 5E-1ChMPGE electrode.

As a result of this study, it was seen that the most successful response in the detection of choline in blood serum was given by 2E-1ChMPGE electrode. The detection range of 2E-1ChMPGE electrode is 71.6 pM-7.16 μM and the limit of detection is 71.6 pM. Besides, the preferred molecular imprinting method for choline detection is superior to many electrochemical studies in the literature as it is particularly easy to apply and economical, and can measure in a short time and at a wide detection limit. The low cost of PGE production, the analysis time is between 4.5-5 minutes and the determination range is wide indicate that the biosensor developed in this study can be used effectively in choline detection.



1. GİRİŞ

Günümüzde çevre, ziraat, savunma, tıp, biyomedikal gibi birçok alanda kullanılan ve kullanımı gittikçe yaygınlaşan biyosensörler, analizi yapılacak örnekler içindeki kimyasal maddelerin değişen derişimi ya da aktivitelerine seçici bir şekilde cevap verebilen ve bu cevapları elektriksel sinyallere dönüştürebilen sistemlerdir. Biyosensörler analizi yapılmak istenen maddeyle etkileşerek onu tanır ve etkileşim sonucu meydana gelen değişimi o maddenin derişimi, yoğunluğu, miktarı gibi büyüklüklerle ilişkilendirir. Biyosensörler özellikle sağlık alanında aktif bir şekilde kullanılmaktadır. Yaygın olarak hastalık yapıcı virüs, bakteri gibi yapıların tespitinde, vücut için zararlı olan maddelerin miktarının belirlenmesinde ya da vücut içindeki miktarı veya miktarındaki değişim bir hastalık belirtici olarak kullanılabilen moleküllerin tespitinde tercih edilmektedir. Moleküler tanıma yeteneğine sahip olması biyosensörleri hastaneye ihtiyaç duymadan her alanda rahatlıkla kullanılabilir hale getirmektedir. Bu tip biyosensörler point-of-care (POC) cihazlar sınıfında yer alırken hastalıkların tanısı, teşhisi ve izlenmesinde oldukça etkili, kullanımı kolay, taşınabilir, hızlı, hassas ve ucuz sistemlerdir. Biyosensörlerde moleküllerin tayini çeşitli yollarla yapılabilirken, elektrokimyasal yöntemler en yaygın kullanılanlar arasındadır. Elektrokimyasal biyosensörler, yapılarında enzim, hücre, doku, nükleik asit gibi maddeleri barındırır. Ayrıca tespit edilmek istenen moleküllerin, iyonların ya da bileşiklerin derişimine bağlı olarak yanıt vererek elektriksel sinyaller oluşmasını sağlar. Derişimde meydana gelen değişim akım, gerilim ya da empedans gibi elektriksel özelliklerin de değişmesine neden olur.

Elektrokimyasal analize dayalı biyosensörlerde kullanılan elektrotlarda molekül tayini yapabilmek için moleküler baskılama yöntemi kullanılarak seçiciliğin artırılması sağlanabilir. Moleküler baskılama yöntemi, elektrotlar üzerinde moleküle özgü tanıma bölgeleri oluşturarak, molekülün o bölgelere tutunmasını sağlar. Bu tanıma bölgelerinin oluşturulmasında oldukça düşük derişimlerde biyomoleküller kullanılarak yüksek hassasiyette ve seçicilikte biyosensörler meydana getirilir. Moleküler baskılama yöntemiyle vücutta bulunan aminoasit, hormon, enzim, tuz

yapıları, vitamin ya da hastalık belirteci olarak görülen maddeler uygun elektrotlar üzerine baskılanarak tayin edilebilir.

Kolin vücutta önemli metabolik rol oynayan, suda çözünen bir B vitamini türüdür. Kan serumunda 7 μM seviyesinde bulunan kolin molekülünün miktarındaki değişim de Alzheimer, Parkinson, prostat ve pankreas kanserleri, bazı karaciğer ve akciğer hastalıkları, otizm gibi bazı hastalıkların habercisi olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle kolin miktarındaki değişimin saptanması hastalık teşhisinde kullanılabilen bir parametre haline gelmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda elektrokimyasal yöntemler kullanılarak üretilen kolin biyosensörleri bulunmaktadır. Daha çok amperometrik yöntemler kullanılarak üretilen bu biyosensörler, enzimatik tepkimelerin açığa çıkardığı hidrojen peroksidin (H_2O_2) oksidasyonuna dayanır. Yapılan başka çalışmalarda metilen mavisi, prusya mavisi gibi medyatörler kullanılarak kolin tespiti yapılmıştır.

Bu çalışmada daha önce kolin molekülü için denenmemiş olan moleküler baskılama yöntemi kullanılarak kolinin kalem grafit elektrot (PGE) üzerine baskılanmasıyla, koline duyarlı biyosensör üretilmiştir. Kolinin moleküler baskılanması yapılırken fonksiyonel monomer olarak metakriloamidoglutamik asit (MAGA), çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve başlatıcı olarak α -*izobütronitril* (AIBN) kullanılmıştır. PGE'lerin ultraviyole (UV) altında bekletilmesiyle polimerizasyon tamamlanarak baskılama işlemi gerçekleştirilmiştir. PGE'lerin HCl ve deiyonize suyla yıkanması sonucunda kolinler uzaklaştırılarak koline özgü bağlanma bölgeleri oluşturulmuştur. PGE'lerin üzerinde oluşan kolin boşluklarına kolinin tutunmasıyla elektrotta meydana gelen empedans, akım ve gerilim gibi elektriksel özelliklerin değişimi elektrokimyasal empedans spektroskopisi kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen CV ve EIS verileri göz önüne alınarak impedimetrik biyosensör geliştirilmiştir. Daha sonra biyosensör, klinik uygulamalarda kullanımının güvenilir ve uygulanabilir olduğunun gösterilmesi için kan serumunda test edilmiştir. Bu çalışma, kolinin tayinini kolaylaştırarak, işlem maliyetini düşürüp, yüksek seçicilik ve hassasiyette, anahtar-kilit yöntemi ile farklı moleküller içeren çözeltilerde kolin tayininin doğru ve güvenilir şekilde yapılması için gerçekleştirilmiştir.

2. BİYOSENSÖRLER

Biyolojik sensör ifadesinin kısaltması olarak kullanılan biyosensörler, biyolojik tanıma mekanizmasıyla algıladığı biyolojik cevabı elektriksel sinyale dönüştürerek analiz edilmesini sağlayan cihazlardır. Analiz edilecek olan maddenin belirlenen algılayıcıyla (elektrotlar, polimerler vb.) etkileşime girmesi sonucu ortaya çıkan sinyalin, iletici bir sistemle birleştirilmesi ve ölçüm sistemine aktarılması şeklinde çalışır. Biyosensörler sıvı ya da gaz ortamda bulunan, analizi yapılmak istenen maddelerin nicel ve nitel tayinini yapabilmektedir.

Biyosensörlerin tıp, mühendislik, gıda, ziraat, eczacılık, tekstil, savunma gibi birçok alanda kullanılabilmesine olanak sağlayan durum kimya, biyoloji, fizik gibi birçok alanın multidisipliner bir çerçevede bir araya gelmesiyle mümkün olmuştur [1-3]. Biyosensörlerin geleneksel yöntemlere alternatif olarak kullanılmasını sağlayan en büyük avantajı gerçek zamanlı cevap verebilmesidir. Bu özelliğinin yanı sıra, geniş derişim aralığında kullanılabilmeleri ve belirlenen maddeye özgü olmaları da biyosensörleri avantajlı hale getirmektedir. Ancak biyobileşenlerin sıcaklık, pH gibi ortam şartlarına duyarlı olması, biyosensörlerin kullanım ömrünün kısalmasına neden olur ve bu durum da biyosensörlerin dezavantajı olarak yer almaktadır [4,5].

2.1 Biyosensörlerin Kullanım Alanları

Biyosensörler çevresel ve tıbbi analizlerde, süreçlerin takip edilmesinde, ilaç analizleri, savunma faaliyetleri gibi çeşitli birçok alanda rahatlıkla kullanılabilmekte ve kullanımı da giderek yaygınlaşmaktadır. Biyosensörler;

- Tıp; hormon, enzim, glikoz gibi moleküllerin teşhisi ve ölçümü yani temel ve klinik teşhis, tayin ve incelemelerde,
- Ziraat, veterinerlik, biyoloji, kimya gibi alanlarda yapılan çeşitli analizlerde,
- Çevre; hava, toprak ve suyun bileşenlerinin tayininde, çevre kirliliklerinin incelenmesinde, toksik gaz analizlerinde,
- Askeri; özellikle savunma sanayisinde, biyoreaktör kontrol ve analitiğinde,

- İlaç analizi ve ilaçların etkileşimlerinin belirlenmesinde,
- Biyomedikal; özellikle hastalıkların teşhisinde çeşitli biyomoleküllerin tanınmasına dayanan, hastayı X ışını gibi zararlı ışınlardan korumaya yönelik sistem geliştirilmesinde,
- Moleküler biyoloji ve biyoteknoloji; özellikle bakteri, virüs, DNA analizlerinde, ilaç-DNA etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılabilir.

Biyosensörler, fizikokimyasal dönüştürücü ile ilişkilendirilen, moleküler tanıma yeteneğine sahip cihazlar olduğu için point-of-care (POC) cihazlar olarak sınıflandırılabilir ve sadece hastane ortamında değil evde ve klinikte yani hastaya yakın bir şekilde rahatlıkla kullanılabilir. POC cihazlarının en temel ve kritik bileşeni performansı doğrudan etkileyen biyosensörlerdir ve bu biyosensörler sayesinde çeşitli hastalıkların tanısı, izlenmesi ve yönetimi için kullanılan biyobelirteçler tespit edilebilir ya da ölçülebilir. Çeşitli biyobelirteçlerin kantitatif tespitinin yapılabildiği POC cihazları taşınabilir, kullanımı kolay, klinik ve biyokimyasal analiz cihazları sayesinde geliştirilmiştir. Bu nedenle POC cihazları hastalıklar hakkında hızlı klinik karar vermeyi sağlayarak erken bir aşamada tedaviyi ve tıbbi müdahaleyi kolaylaştırarak hastanın iyileşmesini önemli derecede etkilemektedir. Hastalıkların erken aşamada teşhis edilmesine olanak tanıdığı için tedaviye erken başlanarak sağlık durumunun daha çabuk iyileştirilmesini sağlar. Bu biyosensörler, fizyolojik sıvıların yüksek duyarlılık ve özgüllükle test edilmesini sağlayarak özellikle otoimmün hastalıkların takip edilmesinde tercih edilen sistemler haline gelmiştir [6,7]. POC cihazlarının, tedavi süresini kısaltması, inme alt tiplerini sınıflandırması ve hastanın sonucunu iyileştirmesi gibi avantajlarının olması hasta yönetimindeki önemini arttırmaktadır. Bu nedenlerle son yıllarda POC cihazlarına gösterilen ilginin yoğunlaşmasıyla 2016'da 23.16 milyon dolar olan POC cihazlarının küresel pazardaki payının 2021'de 36.96 milyona çıkacağı öngörülmektedir [8]. Ayrıca, mikroakışkanlar, çip üstü laboratuvar teknolojileri, sistem entegrasyonu, cihaz otomasyonu ve sinyal okuma gibi tamamlayıcı teknolojiler istenilen POC cihazlarının geliştirilmesine yardımcı olmaktadır.

2.2 Biyosensörlerin Taşınması Gereken Temel Özellikler

Biyosensörlerde bulunması gerekli olan parametreler şunlardır;

Seçicilik, geliştirilen biyosensörlerin, biyoaktif bileşenin de içinde bulunduğu her türlü ortama rağmen, ortamda bulunan diğer maddelerden ve ortam parametrelerinden minimum seviyede etkilenmesi ve analizi yapılacak maddenin en iyi şekilde analizine olanak sağlaması olarak tanımlanır. Ayrıca biyosensörlerin tepkimelerdeki fiziksel parametrelerden ve değişimlerden de mümkün olduğu kadar az etkilenmesi beklenmektedir.

Kullanım ömrünün kısa ya da uzun olması sensörün diğer parametrelerini de yakından ilgilendiren bir durumdur. Özellikle enzim temelli biyosensörlerde, enzim aktivitesindeki düşüş biyosensörün kullanım ömrünün kısaltmaktadır.

Tekrarlanabilirlik, biyosensörün aynı özellikteki çözeltilere daldırılmasıyla ve peş peşe yapılan analizler sonucunda, ölçümlerin standart sapmasının ve korelasyon katsayısının hesaplanmasıyla belirlenen bir parametredir. Analizi yapılacak maddenin kararlılığı, saflık seviyesi ve aktivitesi tekrarlanabilirliğini etkileyen faktörlerdir. Analiz sonucunda elde edilen sonuçların pratikte aynı olması pek mümkün olmadığı için birbirine yakın olması da biyosensörün güvenilirliğini arttıran bir durumdur.

Hızlı yanıt süresine sahip olması biyosensörlerin kullanımını avantajlı hale getirmiştir. 2 farklı ölçüm arasında geçen süre yanıt süresi olarak adlandırılır ve idealde çok kısa olması beklenir.

Kolay üretilebilir ve maliyetinin düşük olması bu tip sensörlerin seri olarak ve fazla miktarda üretilmesine olanak sağlar. Biyosensörlerin ucuz, taşınabilir, tasarımı kolay ve tek kullanımlık olması yaygın bir şekilde kullanılmasına imkan tanır.

Kararlılık, biyosensörlerin ömrünün uzun olup olmadığı, aynı materyalle ne kadar fazla sayıda analiz yapılabileceği ile ilgilidir. Kararlı bir biyosensör çok sayıda analize imkan vererek ekonomik olarak da avantaj sağlar. Bir biyosensörün kararlılığı fiziksel dayanıklılığının yanı sıra, sıcaklık ve pH gibi ortam koşullarından da etkilenmektedir.

Kalibrasyona ihtiyacının az olması ya da kalibrasyona ihtiyaç duymaması ideal biyosensörün taşınması beklenen bir özelliktir.

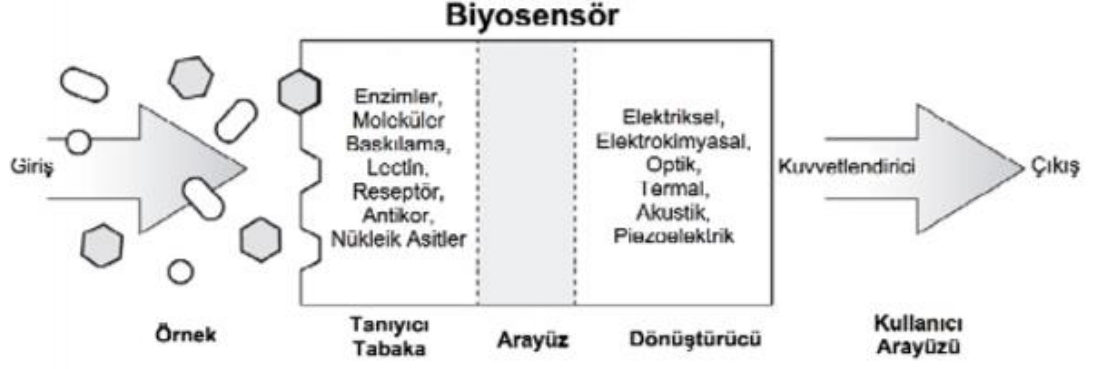
Duyarlılığın yüksek olması, elektrotlardan alınan cevabın sadece belirlenen analite göre değişmesini ifade eder.

Tayin sınırının belirli bir derişimin altında olması ve tayin aralığının da geniş olması biyosensörlerde olması beklenen özellikler olup elektrot yüzeyinin genişliği, kaplanan polimer tabakasının kalınlığı ve afinite gibi özellikler bu değerleri etkileyen faktörlerdir [9].

Boyutunun küçültülebilmesi ve sterilize edilebilir olması biyosensörün tasarımıda önemli bir rol oynar. Ancak, analitin fiziksel dayanıklılığı sterilizasyonu etkileyen önemli bir faktördür [10].

2.3 Biyosensörlerin Algılayıcılar ve Dönüştürücülerden Oluşan Yapısı

Biyosensörler, Şekil 3.1’de gösterildiği gibi temelde 2 kısımdan oluşur; biyo algılayıcı olarak da adlandırılan reseptör, tanıyıcı kısım, seçici tanıma görevini gerçekleştirir yani analizi yapılacak maddenin algılanmasına bağlı olarak hedef analitin derişimiyle orantılı bir şekilde sinyal üretilmesini sağlar. Substrat ile biyobileşenin tepkimeye girmesi sonucu, yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri, proton derişiminin değişimi, kütle değişimi, ısı ya da ışık emisyonu, absorpsiyonu gerçekleşebilir. Böylelikle meydana gelen ürünlerin, ısı, ışık, sıcaklık, akım, potansiyel ya da elektrokimyasal değişimler gibi ölçülebilir forma yani elektronik sinyallere dönüştürülmesi sinyal dönüştürücü sayesinde olur. Sonuç olarak, analit derişimiyle doğru orantılı olan elektriksel sinyaller elde edilmiş olur [11]. Ayrıca elde edilen sinyaller güçlendirilebilir, işlenebilir ya da depolanabilir [12]. Dönüştürücüler; elektrokimyasal, optik, kütle ve ısı değişimine dayanan dönüştürücüler olarak 4 grupta incelenebilir. Dönüştürücü türleri ve çalışma prensipleri Çizelge 3.1’de özetlenmiştir. Sensörlerde kaydedici olarak adlandırılan kısım, dönüştürücü tarafından istenen forma getirilen sinyallerin görüntülenmesini ve kaydedilmesini sağlar.



Şekil 2.1: Biyosensörlerin yapısı [13,14].

Çizelge 2.1: Dönüştürücü çeşitleri ve çalışma prensipleri [15].

Dönüştürücü	Çalışma Prensibi
Elektrokimyasal Sensörler	Analiz edilecek madde ile elektrotlar arasındaki etkileşime dayanarak oluşan elektriksel sinyalleri ölçen sensörlerdir.
Potansiyometrik	Referans elektrot ile çalışma elektrodu arasında oluşan potansiyel farkın ölçülmesi esasına dayanır.
Amperometrik	Sabit bir gerilim uygulandığında, akım değerinin ölçümü prensibine dayanır.
Voltametrik	Devredeki rezistans, kapasitans, iletkenlik ya da empedans değişiminin ölçülmesine dayanır.
Alan etkili (FET) (ISFET)	Yarı iletken teknolojisiyle üretilen, giriş voltajının modüle edilmesi esasına dayanır.
Optik Sensörler	Analiz edilecek maddenin derişimine bağlı olarak optik özelliklerin değişiminin ölçülmesine dayanır.
Reflektans	Geçirgen olmayan ortamlarda, analitin yanı sıra immobilize edilen bir belirtecin kullanılmasıyla ölçüm yapılır.
Luminesans	Gerçekleşen kimyasal bir tepkimenin yaydığı ışık şiddetinin ölçülmesi esasına dayanır.
Floresans	Işınlamayla oluşan pozitif salınım etkisinin ölçülmesine dayanır.
Işık saçılımı	Işığın farklı maddelerle etkileşiminde, saçılımında görülen farklılıklara dayanır.
Absorbans	Geçirgen bir ortamda, analitin ya da tepkimeye girebileceği belirteçlerin absorplama özelliklerinin kullanılmasına dayanır.

Çizelge 2.1 (Devam): Dönüştürücü çeşitleri ve çalışma prensipleri [15].

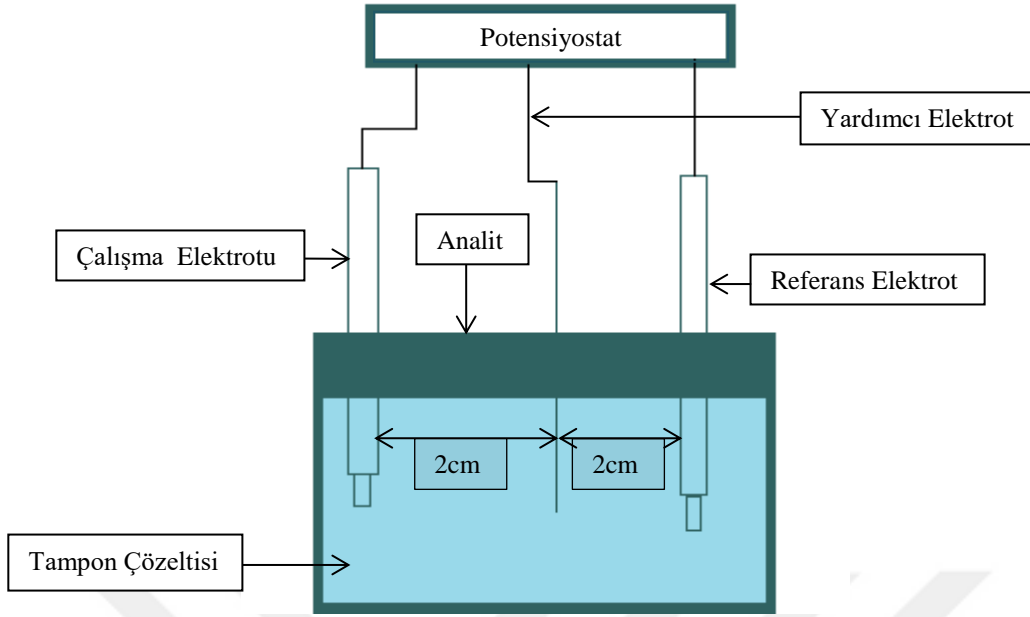
Kırılma indisi	Çözeltinin içerisinde yer alan bileşenlerin değişiminin ölçülmesidir.
Optotermal etki	Işığın soğrulmasıyla oluşan ısıl etkinin ölçülmesi prensibine dayanır.
Termal Sensörler	Analiz edilecek maddeyi içeren bir kimyasal tepkimenin ya da analitin yüzeye tutunma oranının oluşturduğu ısı etkisinin ölçülmesi esasına dayanır.
Kütle Hassas Sensörler	Analitin yüzeyde birikmesiyle gerçekleşen kütle değişikliklerini ölçmeye dayanır.
Piezoelektrik sensörler	Analitin kütesinin artışının meydana getirdiği frekans değişiminin ölçülmesine dayanır.
Yüzey akustik dalga sensörleri	Analitin çökmesiyle meydana gelen akustik dalganın yayılma hızındaki farklılıkların ölçülmesi prensibine dayanır.
Elektriksel Sensörler	Elektrokimyasal bir işlem olmadan, analitin elektriksel özelliklerinde meydana gelen değişimin tespit edilip anlamlı bir sinyale yükseltilmesiyle meydana gelen sensörlerdir.
Metal oksit yarı iletken sensörler	Gaz faz detektörü olarak kullanılan bu sensörler analit gaz bileşenlerinin tersinir indirgenme tepkimeleri kullanılarak elde edilir.
Organik yarı iletken sensörler	Yük aktarım birimlerinin meydana gelmesi prensibine dayanır.
Elektrolitik iletkenlik sensörleri	Bir elektrolit çözeltideki iyonların hareketiyle meydana gelen akımın ölçülmesi prensibine dayanır.
Elektriksel geçirgenlik sensörleri	Manyetik akı yoğunluğunda meydana gelen değişimin ölçülmesi temeline dayanır.
Manyetik Sensörler	Gaz maddelerin analizi yapılırken, paramanyetik özelliklerinde gerçekleşen değişikliklerin ölçülmesine dayanır.
Diğerleri	α, β, γ ışınlarını temel alan radyasyon sensörleri gibi sensörlerin, analitin kimyasal bileşenlerini belirlemesi temelli sensörler örnek olarak verilebilir.

3. ELEKTROKİMYASAL ÖLÇÜM

Redoks (indirgenme-yükseltgenme) tepkimelerinin gerçekleşmesiyle elektriksel enerjinin üretildiği veya harcandığı tepkimelerin tümünü içine alan bilim dalına elektrokimya denir. Elektron aktarımı, yükseltgenme (elektron kaybı) – indirgenme (elektron kazanımı) tepkimelerinin gerçekleşmesiyle olur. Elektrokimyasal tepkimeler, elektrokimyasal hücre olarak adlandırılan hücrelerde, elektronların bir yerden başka bir yere geçişiyle gerçekleşir ve bu tepkimelerin gerçekleşmesi için, analiz edilecek maddeyi içeren elektriksel iletkenliğe sahip bir çözelti, (genellikle tampon çözelti olarak adlandırılır), elektrot sistemi (ikili veya üçlü) ve de elektrotların birbirine bağlanmasına yarayan çevrim sistemi gereklidir. Genel olarak, hücre içerisindeki tepkimenin elektrotlara mümkün olduğunca yakın gerçekleşmesi istenir çünkü ürünler her yöne ve yüzeyden uzaklaşacak şekilde dağılım gösterebilir. Bu durum da elde edilmesi beklenen sinyalde farklılıklara neden olabilir [16,17].

3.1 Elektrokimyasal Analizde Kullanılan Elektrotlar

Elektrokimyasal analizde kullanılacak elektrot sistemleri iki elektrotlu veya üç elektrotlu sistemlerdir. İki elektrotlu sistemlerin yanı sıra üç elektrotlu sistemlerde çalışma ve yardımcı elektroda ek olarak bir de referans elektrot yer almaktadır. Üç elektrotlu elektrokimyasal bir ölçüm için kullanılan deney düzeneği Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Referans elektrot konumlandırılırken polarizasyon katmanına yakın olması sağlanır. Böylelikle polarizasyon çift katmanlı kapasiteden çalışma elektroduna doğru olan voltaj farkının ölçülmesini sağlar. Kütle taşınımı, kimyasal ve adsorpsiyon adımları ve elektron transferlerinin tümünün toplanmasıyla, hücrede oluşan toplam potansiyel hesaplanabilir [18].

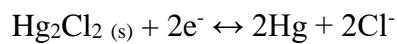


Şekil 3.1: Üçlü elektrot sistemi.

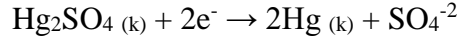
3.1.1 Referans elektrot

Elektrokimyasal analizlerde, potansiyeli sabit kalan, çözeltinin bileşiminden ve dış ortamlardan etkilenmeyen elektrotlar referans elektrot olarak adlandırılır. Anot potansiyeli ile katot potansiyeli arasındaki farka hücre potansiyeli denir ve elektron enerjisinin ölçümü olarak ifade edilir. Referans elektrot, uygulanan ve değeri bilinen potansiyel değerine karşı, çalışma elektrodu ile çözelti arasındaki sabit ve tekrarlanabilir potansiyelin korunmasını sağlar. Standart Hidrojen Elektrot (SHE), Kalomel Elektrot, Civa-Civa (I) Sülfat Elektrot ve Gümüş-Gümüş Klorür (Ag/AgCl) Elektrot en çok kullanılan referans elektrotlardır. Standart Hidrojen Elektrot (SHE), hidrojen iyonlarının yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerinden faydalanılarak, potansiyeli bilinmeyen bir elektrodun standart potansiyelini belirlemek için kullanılan referans elektrot çeşididir. Bu elektrodun potansiyelinin tüm sıcaklık değerleri için sıfır olduğu varsayılır. Bu elektrodun hazırlanmasının kolay olmaması kullanılabilirliğini azaltan önemli bir faktördür [19]. Kalomel Elektrot (Hg₂Cl₂), referans elektrot olarak tercih edilen ve kolay hazırlanan elektrotlardan bir tanesidir, ancak sıcaklık değişikliklerinden kolay etkilenir. Klorür iyonlarının aktifliği elektrot potansiyeliyle doğrudan ilişkilidir.

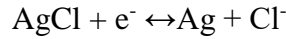
Elektrotta meydana gelen tepkime şu şekildedir:



C₁va-C₁va(I) Sülfat elektrodunda potansiyel sülfat iyonlarının aktifliği ile bulunur. Elektrotta gerçekleşen tepkime aşağıdaki şekildedir:



Gümüş-gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrot, referans elektrodu olarak en yaygın kullanılan elektrot çeşididir. Elektrot, gümüş bir telin AgCl ile kaplanarak bir tüp içerisindeki Cl⁻ iyonu içeren bir çözeltiye batırılmasıyla elde edilir. Sıcaklık değişiminden etkilenmemesi yüksek sıcaklıklarda kullanımını elverişli hale getirmektedir. Ayrıca gümüş-gümüş klorür referans elektrodunun daha az analitle tepkimeye girmesi önemli bir avantajdır. Elektrotta oluşan tepkime şu şekildedir:



3.1.2 Çalışma elektrotları

Yüzeyinde indirgenme-yükseltgenme tepkimeleri gerçekleşen ve buna bağlı olarak potansiyeli zamanla değişen elektrotlar çalışma elektrodu olarak adlandırılır. Aynı zamanda çalışma elektrotları akım ölçümünün yapıldığı elektrotlardır. Yapımında altın, platin, civa gibi iletken malzemeler kullanılabilirken, karbon bazlı ya da modifiye elektrotlar da olabilmektedir. Bu elektrotlar, tasarlanacak biyosensör sistemine göre en uygun şekilde seçilip, istenilen şekil ve büyüklükte hazırlanabilir. Elektrot malzemesi ve kullanılan çözeltinin derişimine bağlı olarak elektrotların kullanıldığı potansiyel aralıkları değişiklik göstermektedir.

Çalışma elektrotları; karbon elektrotlar, civa elektrotlar ve diğer elektrotlar olarak sınıflandırılabilir.

3.1.2.1 Karbon elektrotlar

Karbon elektrotlar, çalışma potansiyel aralığının geniş olması, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması, elektriksel direncinin düşük olması, yüzey yapısının tekrarlanabilirliğe uygun olması, artık akım miktarının düşük olması ve anodik potansiyel aralığının geniş olması gibi birçok avantaja sahip olması nedeniyle elektrokimyasal analizlerde sıklıkla tercih edilen çalışma elektrotlarıdır. Farklı fonksiyonel gruplarla karbon yüzey arasında rahatlıkla kimyasal bağ kurulabilmekte ve bu sayede yüzeye değişik maddelerin tutunumu sağlanmaktadır.

Grafit elektrot, karbon pastası elektrodu (CPE), camsı karbon elektrot ve perde baskılı karbon elektrotlar olarak sınıflandırılabilir.

Grafit elektrotlar, grafit kömüründen çubuk şeklinde ya da istenilen ebatta hazırlanarak elektrokimyasal analizlerde sıklıkla kullanılır. Kolay hazırlanması, ucuz olması ve geniş çalışma yüzeyine sahip olması grafit elektrot olarak kalem grafit elektrotların tercih edilmesine neden olmuştur [20,21]. Yapılan bu çalışmada da, Tombo 0,9 mm 2B kalem ucu, kalem grafit elektrot olarak kullanılmıştır.

Karbon pastası elektrotlar (CPE), %70 grafit ve %30 bağlayıcı maddenin 2-4 mm çapındaki cam yada teflon borularda sıkıştırılmasıyla hazırlanan ve elektriksel iletkenliğin iletken bir telin borunun 2/3 üne kadar uzatılmasıyla sağlandığı elektrot çeşididir. Kullanılan bağlayıcı maddenin oranındaki değişim, elektrodun elektron transfer hızını doğrudan etkilemektedir. Hazırlanmasının kolay olması, ucuz olması ve yenilenebilir yüzeye sahip olması elektrokimyasal analizlerde kullanılmasını yaygınlaştırmıştır.

Camsı karbon elektrotlar, fenol/formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin, yüksek sıcaklık ve basınç altında, karbonizasyona uğratarak, gözenek büyüklüklerinin azaltılmasıyla elde edilir. Gözenek büyüklüklerinin azalmasıyla likit ve gaz geçirgenliği artırılmış olur. Karbon pastası elektrotlarıyla karşılaştırıldığında daha pürüzsüz ve düzgün bir yüzeye sahip olup, fiziksel dayanıklılığı da daha fazladır [22,23].

Perde baskılı karbon elektrotların duyarlılığının ve uyumluluğunun yüksek olması, elektrokatalitik aktivite özelliklerinin ve stabilitesinin iyi olması, bu elektrotların biyosensör tasarımında tercih edilir hale gelmesine neden olmuştur.

3.1.2.2 Cıva elektrotlar

Metalik yüzeylerde, her bir cıva damlasının taze bir yüzey oluşturmasıyla ölçümler gerçekleştirilir. Cıva kolay yükseltgenebilir olduğu için anot olarak kullanılabilir potansiyel aralığındadır. Bu neden ve cıvanın toksik bir metal olması, cıva elektrotların dezavantajlarıdır [24]. Damlayan cıva elektrot, disk elektrot, asılı cıva damla elektrot ve durgun cıva damla elektrot cıva elektrotların en çok kullanılan çeşitleridir.

3.1.2.3 Diğer elektrotlar

Katı elektrotlar (metal elektrotlar), nano elektrotlar, karbon fiber elektrotlar, ultramikroelektrotlar, modifiye elektrotlar, dönen disk ve halka elektrotlar, mikrokarbon elektrotlar bu grupta sayılabilecek elektrotlardır.

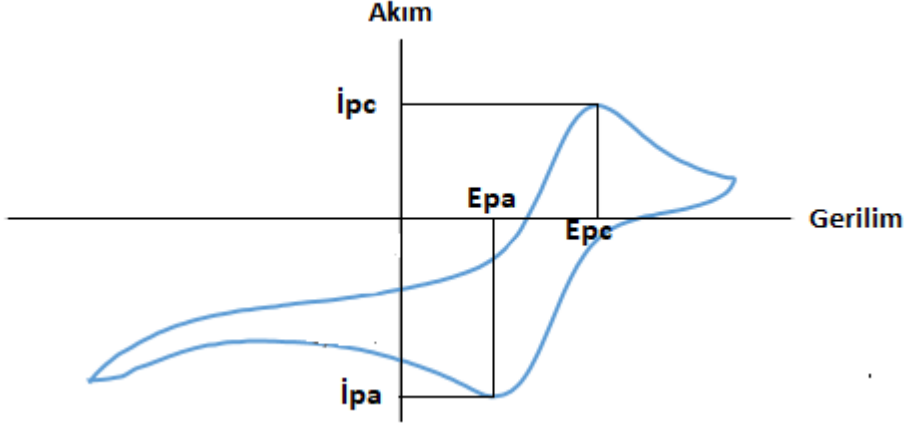
3.1.3 Yardımcı elektrot

Yardımcı elektrotlar genellikle tel çubuk şeklinde kullanılır ve platin, grafit, tantal, tungsten gibi tepkimeye katılmayan maddelerden meydana gelir. Karşıt elektrot olarak da bilinen yardımcı elektrodun görevi akımın çözelti ortamından geçerek çalışma elektroduna iletilmesini sağlamaktır ve bu akım referans elektrot ile elektrot-çözelti gerilimini korumaya yarar.

3.2 Dönüşümlü Voltametri (CV)

Dönüşümlü voltametri yöntemi ile, belirlenen başlangıç ve bitiş gerilim değerleri arasında, sabit bir hızda değişecek şekilde bu gerilimin uygulanmasına karşın elde edilen akım ölçülür. Bu gerilim önce başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline doğru pozitif veya negatif yönde uygulanır, daha sonra bitiş potansiyelinden başlangıç potansiyeline doğru uygulanarak, sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı, akımda meydana gelen değişiklikleri ifade eden grafik, 'Dönüşümlü Voltamogram' elde edilir. Dönüşümlü voltametri, çalışma elektrodundaki yükseltgenbilir maddenin miktarının bilgisini verir. Analize başlamadan önce elde edilen dönüşümlü voltamogramla maddenin elektrokimyasal özellikleri saptanıp, analiz sonucunda da yükseltgenme ya da indirgenme tepkimesi gösterip göstermediği, bu tepkimelerden nasıl etkilendiği ve elektriksel davranışları belirlenebilir. Çözeltideki analit derişimine bağlı olarak, yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri elektrot yüzeyinin yakınındaki difüzyon tabakasında meydana gelir. Elektrot yüzeyinin analitle kaplandığı durumlarda, yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri analitin tamamını ifade etmektedir. Bu yüzden bu gibi analizlerde tarama hızının yavaş olması gerekmektedir. Analiz yapılan çözeltinin derişimi arttıkça, elektrot yüzeyine tutunan moleküller, gerçekleşecek olan yük transferinin engellenmesine neden olur. Bu durum da indirgenme ve yükseltgenmeden kaynaklı oluşan piklerin düşmesine neden olur.

Şekil 3.2'de ifade edilen E_{pc} katodik pik potansiyeli, i_{pc} katodik pik akımı, E_{pa} anodik pik potansiyeli, i_{pa} anodik pik akımı dönüşümlü voltamogramın önemli parametreleridir.



Şekil 3.2: Dönüşümlü Voltamogram

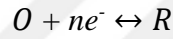
Elde edilecek voltamogramın şeklinin ve yapısının belirlenmesinde; kullanılacak potansiyel aralığı, tarama sayısı ve hızı etkilidir. Bu yöntemde tarama hızı değiştirilerek, elde edilen akım değerleriyle, meydana gelen tepkimelerin çeşitli parametreleri incelenebilir.

Çalışma elektrodu üzerinde meydana gelen, yükseltgenme tepkimesi sonucu oluşan negatif işaretli akıma anodik akım, indirgenme tepkimesi sonucu oluşan pozitif işaretli akıma katodik akım denir. Analiz edilecek maddenin kütle aktarımının, elektrot yüzeyine taşınma hızına bağlı olması bir sınır akımının oluşmasına neden olur. Uygulanan potansiyel değerine bağlı olarak akımın, keskin bir artış gösterdikten sonra ulaştığı sabit değer sınır akımı, i_s , olarak adlandırılır. Bu sınır akımı analiz edilecek maddenin derişimiyle doğru orantılı şekilde değişiklik gösterir. Yöntemin duyarlılığının belirlenmesinde, artık akımın büyüklüğü önem göstermektedir. Elektrot üzerinde herhangi bir yükseltgenme veya indirgenme tepkimesinin gerçekleşmediği zaman gözlemlenen, küçük de olsa var olan akıma artık akım denir. Duyarlılığın artmasında artık akımın yok edilmesi ya da en aza indirilmesi önem taşımaktadır. Sınır akımın yarısına eşit olan akıma karşılık gelen potansiyel değeri yarı dalga potansiyeli, $E_{1/2}$, olarak adlandırılır [19,25].

Elektrot çözelti ara yüzeyinde akımın iletimi, Faradayik akım ve Kapasitif akım olarak iki şekilde gerçekleşir. Faraday yasasına göre elektrotta meydana gelen kimyasal tepkimenin miktarı geçen akımla orantılıdır. Bu yasaya uygun olarak, elektrotların birinde yükseltgenme tepkimesi meydana gelirken, diğerinde indirgenme tepkimesinin meydana gelmesi ve elektronların doğrudan aktarımı yoluyla iletilen akıma Faradayik akım, i_f , denir. Elektrolit çözeltisine batırılan

elektrot negatif yükle yüklenir. Bu durum, pozitif yüklü iyonların elektroda doğru hareket etmesine ve böylelikle de ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşmasına neden olur. Zıt işaretli yüklerin ara yüzeyin iki tarafında birikmesiyle bu alanda elektriksel çift katman olarak adlandırılan ve kapasitör gibi davranan bir tabaka oluşur. Oluşan bu kapasitörün yüklenmesi için, ortamda yükseltgenecek ya da indirgenecek bir madde olmasa bile, tepkimeden bağımsız olarak sistemden kaynaklı oluşan akım kapasitif akım, i_c , olarak adlandırılır. Kapasitif akımın düşük olması yapılan ölçümlerin doğruluğunu arttıran bir faktördür.

Elektrokimyasal analizlerde, elektrot yüzeyindeki maddelerin derişimlerinin, elektrot potansiyelleri kullanılarak elde edilmesi Nernst deklemini (3.1) ile açıklanabilir. Bu durum geçen akımın elektrotlardaki kimyasal madde miktarıyla doğru orantılı olduğunu göstermektedir. Uygulanan gerilim sonucu oluşan bu akım elektrot ve çözelti arasındaki yüzeyden iletilir ve bu iletim sırasında elektrotlarda yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerinin meydana gelmesine neden olur.



O, redoks çiftinin yükseltgenmiş halini belirtirken, R ise redoks çiftinin indirgenmiş halini belirtmektedir.

$$E = E^0 + \frac{2,3 RT}{nF} \log \frac{[O]}{[R]} \quad 3.1$$

E^0 : standart elektrot potansiyeli

R: gaz sabiti ($8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T: sıcaklık (Kelvin)

n: tepkimelerde transfer edilen elektron sayısı

F: Faraday sabiti (96,487 kulomb)

[O]: yükseltgenen maddenin derişimi (mol/L)

[R]: indirgenen maddenin derişimi (mol/L)

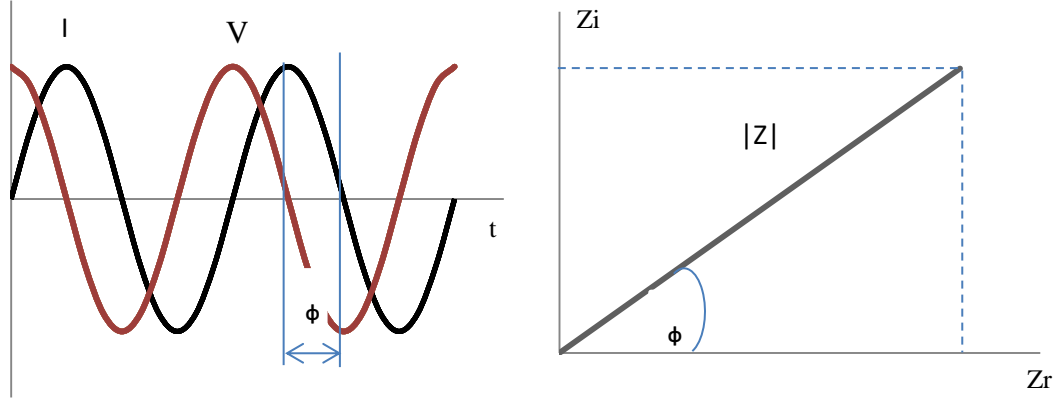
3.3 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), çeşitli elektrokimyasal sistemleri karakterize etmek ve bu sistemlere elektrot veya elektrolitik süreçlerin katkısını belirlemek, bağlanma kinetiklerini incelemek, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimi analiz etmek, sistemlerin elektriksel dirençlerini belirlemek amacıyla kullanılan güçlü bir tekniktir. Biyosensörlerin hazırlanmasında, biyomoleküllerin etkileşimlerinin takip edilmesi ve analizlerinde, biyoreseptör ve analit arasındaki etkileşimin belirlenmesinde ve yüzey karakterizasyonlarında EIS yöntemi yaygın olarak kullanılan bir teknik haline gelmiştir. Empedans ölçüm methodu, elektrokimyasal algılama için, modifiye elektrotların yüzeylerinde gerçekleşen biyolojik tanıma olaylarının meydana getirdiği elektriksel özelliklerdeki değişimin ölçülmesinde oldukça kullanışlıdır. Elektrot yüzeyinde meydana gelen bağlanma olayları iki elektrot arasındaki çözeltide elektriksel özelliklerin değişmesine neden olur. Çözeltinin iletkenliğinde meydana gelen değişimler empedansın gerçek bileşeninde, $Z_r(\omega)$, değişikliğe yol açarken çözeltinin kapasitansındaki değişimler empedansın sanal bileşeninde, $Z_i(\omega)$, değişikliğe neden olur.

Bir elektrik devresinde empedans, devrenin, bütün devre elemanlarının, elektriksel akıma karşı gösterdiği direncin ölçüsü olarak tanımlanabilir. Empedans, devredeki direnç, kapasitans ve endüktansın yani devrede bulunan pasif elemanların birleşimi olarak ifade edilir. Uygulanan frekans değiştikçe kapasitans ve indüktans değeri de değişiklik gösterdiği için elde edilen empedans değerleri de farklılaşmaktadır. EIS tekniği frekans alanında çalıştığı için devre; sensör, çözelti, çözeltide bulunan analitlere bağlı olarak, bu pasif elemanların kombinasyonu şeklinde modellenebilir. Devreye bir alternatif gerilim uygulandığında, Ohm Yasası kullanılarak akım hesaplanır. Bu akım çalışma elektrodu, biyolojik materyal, çözelti ve yardımcı elektrot gibi sistemde yer alan bütün elemanları dolaşır. Böylelikle elde edilen empedans değeri bu elemanların katkılarını ifade etmektedir. Empedans elde edilirken, $V(t)$ zamana bağlı potansiyel fonksiyonu, $I(t)$ zamana bağlı akım fonksiyonuna bölünür. V_0 ve I_0 değerleri maksimuma ulaştığında f ; frekans, t ; zaman, φ zamana bağlı potansiyel ile zamana bağlı akım arasındaki faz farkıdır. Y ise admitans olarak adlandırılan kompleks iletkenliktir. Şekil 3.3'te, empedans değeri,

potansiyel ve akıma bağlı olarak, gerçek ve sanal kısımdan oluşacak şekilde ifade edilmiştir.

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi ft)}{I_0 \sin(2\pi ft + \phi)} = \frac{1}{Y} \quad 3.2$$



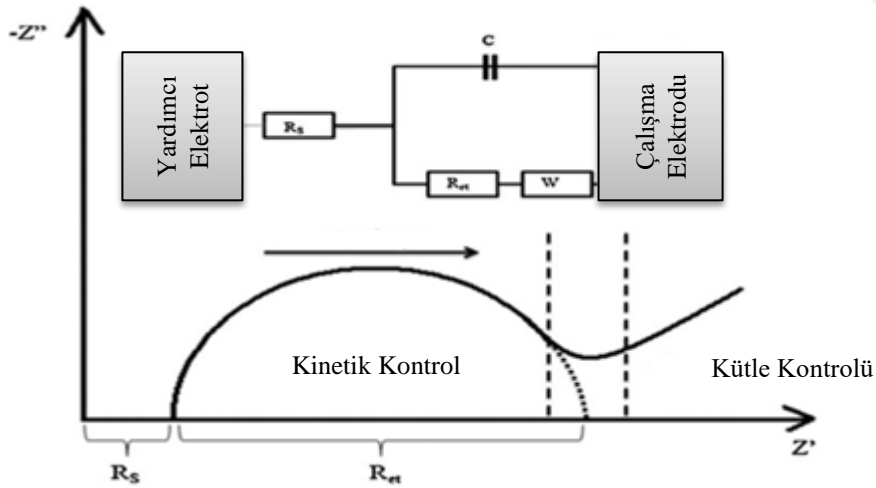
Şekil 3.3: Empedansın potansiyel ve akıma bağlı olarak gösterimi.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile biyolojik bir maddenin empedansı, zamanın bir fonksiyonu olarak ya da analiz edilecek maddenin derişimin bir fonksiyonu olarak elde edilir. Ara yüzey empedansını arttırmaktan kaçınmak için, çözeltiden dolayı oluşabilecek biyolojik maddelerin spesifik olmayan bağlantıları olabildiğince engellenmelidir. Ayrıca çalışma elektroduna analiz edilecek maddenin immobilize edilmesi ve çözeltiyle ilişkisinin belirlenmesi yani empedansının ölçülmesi nedeniyle, yardımcı elektrodun empedansının oldukça küçük olması gerekmektedir. Elektrokimyasal ölçümlerde, yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinin gerçekleşmesi için çözeltide $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]^{-3/4}$ redoks çifti olarak kullanılmıştır.

3.3.1 Sonuçların yorumlanması

EIS ölçümleri değerlendirilirken elde edilen empedans verisi ve grafikler ile eşdeğer devre arasındaki ilişki göz önüne alınır. Farklı frekanslarda ölçülen empedans değeri, Z, gerçek (Z') ve sanal (Z'') kısımdan oluşur. $Z = Z' + jZ''$, empedans grafiği, Nyquist diyagramı, empedans diyagramı ya da empedans spektrumu olarak adlandırılır. Elde edilen bir diğer grafik Bode diyagramıdır ve empedans modülünün logaritmasını ($\log|Z|$) ve faz yer değiştirmesini frekansın logaritması olarak gösterir. Nyquist diyagramı aynı zamanda Argand gösterimi ya da Colo-Cole gösterimi olarak da adlandırılır ve bu diyagram bir dizi noktanın bir araya gelmesiyle oluşur. Bu

noktaların her biri, bir frekans değerine karşılık gelen empedans vektörünün büyüklüğünü ve yönünü ifade eder [26]. Bu diyagram karmaşık düzlem içeren Kartezyen koordinat sisteminde gösterilir ve x eksenini gerçek kısım (dirençli terimler) temsil ederken, y eksenini sanal kısım (kapasitif veya endüktif terimler) temsil eder. Kartezyen düzleminde ifade edilen empedans değerleri geniş bir frekans aralığı (100 kHz-0.1 mHz) kullanılarak, baskın elektrokimyasal mekanizmaya göre tipik bir konfigürasyon elde edilmesini sağlar. Tipik bir Nyquist diyagramı ve eşdeğer devresi Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Nyquist diyagramı bir yarım daire ve lineer bir doğrudan oluşmaktadır. Diyagramda yer alan yarım dairenin çapı yük transfer direncini, R_{ct} , ifade etmektedir [27]. Yük transfer direnci aynı zamanda polarizasyon direncine, R_p , eş değerdir. Ayrıca yarım daire kısmı yüksek frekans bölgesidir ve elektron transferiyle ilgilidir. Yarım dairenin çapının büyük olması direncin de büyük olduğunu gösterir ve bu da konsantrasyonun arttığını ve korozyon oranının da düşürülmüş olduğunu belirtir [28]. Nyquist diyagramında lineer kısım alçak frekans bölgesidir ve eğri boyunca yük transferi oldukça azdır ve difüzyonla ilgili süreci ifade eder. Kapasitans modellemesi, maksimum sinyal değişikliğinin meydana geldiği alçak frekans bölgesine göre yapılır.



Şekil 3.4: Nyquist diyagramı ve eşdeğer devresi [28].

Nyquist diyagramlarında yarım daire kısmı her zaman oluşmayabilir. Bu durum da diyagramın sadece lineer kısımdan oluştuğunu yani alçak frekans bölgesinin baskın olduğunu gösterir. Bu nedenle hedef molekülleri içeren bir çözelti analizi yapıldığında, serbest ve bağlı moleküllerin arasında denge durumu söz konusu olur. İkinci durum ise, gözenek tıkanması olarak adlandırılan durumun oluşmasıdır. Bu durumda kalan boşlukların sayısı, hedef molekülün derişimiyle ters orantılıdır [29].

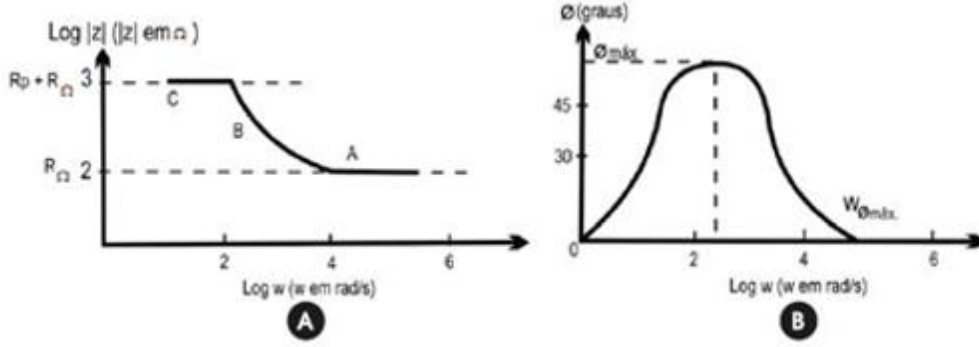
R_{ct} ile hedef molekülün derişimi arasındaki ilişki, R_{ct} nin etkin bir analitik sinyal olarak kullanılmasına olanak tanır. Bir derişim aralığında ya da belirli bir derişim noktasından sonra Nyquist diyagramındaki yarım daire kısmı değişkenlik göstermeyebilir. Bu durum da bağlanma boşluklarının doyum noktasına ulaştığını gösterir.

Bode diyagramlarında, x ekseninde açısal frekansın logaritması ($\log\omega$)(rad/sn) yer alırken, y ekseninde empedansın logaritması ($\log|Z|$) (ohm (Ω)) ve faz açısı (Φ) (derece) yer alır. x eksenini frekansın logaritması ($\log f$) (Hertz) şeklinde de ifade edilebilir. $\log\omega$ ile $|Z|$ nin yer aldığı diyagram incelendiğinde R_{ω} ve R_t belirlenebilir. $\log\omega$ ile faz açısını içeren grafik ele alındığında ise elektriksel çift katman kapasitansı C_{dl} elde edilebilir [30].

$$R_p = 2 \cdot |Z| \cdot f_{max} \quad 3.3$$

$$\omega_{\phi_{max}} = \frac{1}{C_{dl} \cdot R_p \cdot \left(1 + \frac{R_p}{R_{\Omega}}\right)^{\frac{1}{2}}} \quad 3.4$$

Yukarıdaki denklemlerde yer alan f_{max} sistem empedansının maksimum faz açısını, $\omega_{\phi_{max}}$ ise f_{max} ve $|Z|$ 'ye karşılık gelen açısal frekansın f_{max} ile eşleşen empedans modülünü belirtir. Bode diyagramında yer alan yüksek frekans bölgesi (Şekil 3.5A, A bölgesi) özellikle malzeme üzerindeki kaplama tiplerinin karakterizasyonu için ve pasivasyon filmlerinin varlığının tespit edilebilmesi için kullanılır. Orta frekans bölgesinde (Şekil 3.5A, B bölgesi) korozif bir ortamda kaplamanın elektriksel iletkenliğinin bilgisi elde edilebilir. Düşük frekans bölgesine (Şekil 3.5A, C bölgesi) bakılarak ise korozyon tepkimelerinin gerçekleştiği metal/kaplama ara yüzeyinin bilgisi elde edilebilir. Şekil 3.5B ise açısal frekans ile faz açısı değişiminin birbiriyle olan ilişkisini ifade etmektedir [26].



Şekil 3.5: Açısal frekansın bir fonksiyonu olarak elektrokimyasal bir sistemin empedansını (modül ve faz açısı) gösteren Bode diyagramı [31].

3.3.2 Eşdeğer devre

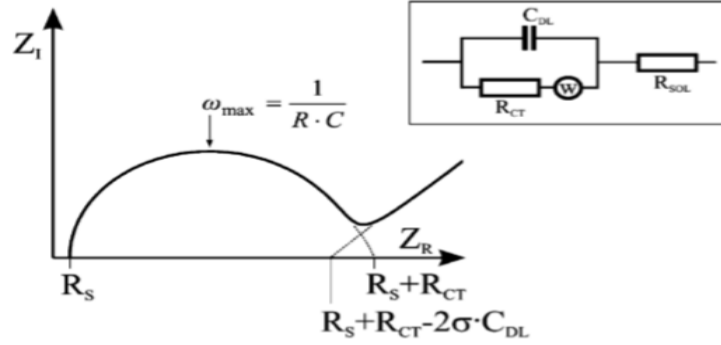
EIS ile inceleme yapılırken, empedansın davranışını açıklamak için; ohmik direnç, kapasitans, sabit faz ögesi ve Warburg empedansından yararlanır. Bu öğelere ve tanımlamalarına Çizelge 3.1’de kısaca yer verilmiştir.

Çizelge 3.1: Empedans davranışını açıklamak için kullanılan elemanlar, tanımlamaları, faz açıları ve frekansa bağımlılıkları [32].

Empedans Elemanı	Tanımlaması	Faz Açısı	Frekansa Bağımlılığı
R	$Z=R$	0°	Yok
C	$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$	90°	Var
CPE	$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^a}$	$0^\circ-90^\circ$	Var
W (infinite)	$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}(1-j)$ $\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 \sqrt{2}} \left(\frac{1}{\sqrt{D_0 C_0}} + \frac{1}{\sqrt{D_R C_R}} \right)$	45°	Var

Eşdeğer devre, deneylerden elde edilen empedans değerlerini, seri ve/veya paralel olarak bağlanmış empedans elemanlarından belirlemek için kullanılır ve elektrokimyasal düzenek bu şekilde analiz edilebilir. Randles devresi, eşdeğer devrenin modellenmesi için en yaygın kullanılan devre modelidir. Bu modelin temelinde elektrodun temasta olduğu bir sistem yer alır; çözelti direnci R_s , yük

transfer direnci R_{ct} , çift katman kapasitansı C_{dl} , ve Warburg empedansı Z_W ile gösterilir. Çift katman kapasitansı C_{dl} , Şekil 3.6' da gösterilen Nyquist diyagramında yer alan yarım dairenin maksimum yaptığı noktadaki frekans kullanılarak hesaplanabilir. R_s , elektrolit çözeltisinin direnciyle, Z_W , redoks çiftinde gerçekleşen yük transferiyle ilişkilidir. R_{ct} ve C_{dl} çözeltideki değişimden kaynaklı, elektrotta meydana gelen değişimlerle ilişkilidir.



Şekil 3.6: Randles eşdeğer devre modeli.

3.3.2.1 Elektrolit direnci

Elektrokimyasal bir hücrenin empedansının belirlenmesinde çözeltinin direnci önemli bir rol oynamaktadır. Üç elektrotlu sistemlerde, elektrot potansiyostatı, yardımcı elektrot ve referans elektrotları arasındaki çözelti direncini dengede tutmayı sağlar. Fakat hücre modellemesi yapılırken çalışma elektrodu ile referans elektrot arasındaki çözelti direnci dikkate alınarak modelleme yapılır. İyonik derişim, iyonların çeşitleri, sıcaklık ve akımın iletiildiği alanın geometrisi, iyonik çözeltinin direncinin belirlenmesinde rol alan önemli faktörlerdir. Direnç, eşit akımın taşıdığı sınırlı bir alanda aşağıdaki şekilde ifade edilebilir [58].

$$R = \rho \frac{l}{A} \quad 3.5$$

A alan, l uzunluk ve ρ çözelti özdirenci ifade etmektedir. $\rho(\kappa)$ değişkeni yaygın olarak kullanılır ve κ çözeltinin iletkenliği olarak tanımlanır. Çözelti direnci ve κ arasındaki bağıntı aşağıdaki denklemdeki şekilde gösterilir:

$$R = \frac{1}{\kappa} \cdot \frac{l}{A} \Rightarrow \kappa = \frac{l}{RA} \quad 3.6$$

3.3.2.2 Çift katman kapasitansı

Elektriksel çift katman, bir elektrot ve çözelti arasındaki ara yüzde meydana gelen olaylar doğrultusunda oluşur. Yüzeysel akım yoğunluğu, indirgenen ve yükseltgenen maddelerin elektron kaybetme ve kazanma hızları olarak adlandırılır. Elektronların elektrottan ayrılması çözeltiye göre pozitif yüklenmesi demektir ve böylece bu bölgedeki katyon derişimi azalmış olur. Bu ara yüzey, elektrot yüzeyindeki pozitif yük tabakası ve yakınındaki negatif yük tabakasından oluşur ve yüklü elektrot, yüklü iyonlardan, genellikle angstrom büyüklüğünde, bir yalıtım alanı ile ayrılmış olur. Bu bölgedeki kapasitansın oluşumu, bir izolatörle ayrılan yükler sayesinde olur ve böylece elektrolit içine daldırılmış bir metalin kapasitör gibi davranmasına neden olur. Çift katman kapasitesi her 1 cm² elektrot alanı için 20-60 µF aralığında değer alabilir. Bunun dışında elektrot potansiyeli, iyonların derişimleri ve çeşitleri, oksit tabakaları, elektrot yüzeyinin pürüzlülüğü, safsızlık adsorpsiyonu ve sıcaklık gibi birçok değişkene bağlı olarak farklılık göstermektedir [33].

$$X_C = \frac{1}{\omega C} = \frac{1}{2\pi f C} \quad 3.7$$

X_C, kapasitörün empedansını ifade etmektedir.

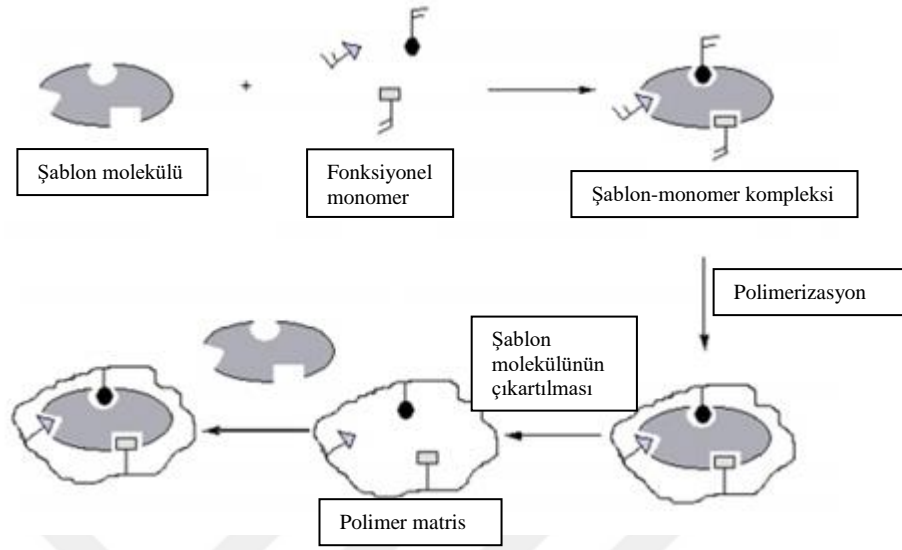
4. MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ

Moleküler baskılama, fonksiyonel grupların (monomerlerin), kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle, boyut, şekil ve mekansal düzenindeki modeline tamamlayıcı olarak polimerik matrislerde yapay tanıma alanları oluşturma teknolojisidir. Baskılama işlemi tamamlandıktan sonra, baskılanan molekülün uzaklaştırılmasıyla, polimerik yapıda baskılanan moleküle özgü, onun moleküler yapısı şeklinde boşluk oluşur. Elde edilen moleküler baskılanmış polimerler, kimyasal tayin, kataliz ve polimer ayırma gibi çeşitli işlemlerde kullanılabilirken doğal biyolojik yapılardan daha dayanıklı ve maliyetinin daha düşük olması, polimerlerin depolama ömrünün uzun olmasından tanıma kapasitelerini birkaç yıl boyunca oda sıcaklığında koruyabilmesi, moleküler baskılanmış polimerlerin tercih edilen malzemeler haline gelmesine neden olmuştur [34]. Moleküler baskılanmış polimerlerin, baskılama sürecinde kullanılan hedef molekül için afinite, seçicilik, kararlılık, kolay sentezlenebilirlik ve çeşitli uygulamalarda rahatlıkla kullanılabilme gibi özelliklere sahip olması doğal reseptörlere benzerlik göstermektedir ve moleküler baskılanmış polimerleri uygulamada avantajlı hale getirmektedir. Ayrıca moleküler baskılama yöntemiyle yüksek seçiciliğe sahip, ortam koşullarına (pH, sıcaklık, konsantrasyon değişimi gibi) ve değişimlerine dayanıklı, asitlere, bazlara, metal iyonlarına ve organik çözücülere karşı yüksek inertliğe sahip, yüksek fiziksel dayanıklılığa, mukavemete, yüksek sıcaklığa ve basınca dayanıklı polimerler elde edilir. Moleküler baskılama yönteminde en önemli iki özellik reseptörlerdeki spesifik molekülü tanıma ve bağlanma özellikleridir. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) elde edilen polimer miktarına, yoğunluğuna ve boyutuna bağlı olarak, çeşitli miktarlarda bağlanma merkezi içerir, bu durum da polimerlerin adsorpsiyon kapasitesini artırır. Moleküler baskılama çalışmalarında, pek çok molekül başarıyla baskılanmıştır. Baskılanan molekülün baskılama işlemi sonunda polimerden uzaklaştırılması gerektiği için, baskılanacak molekülün küçük olmasının gerekliliği bu konuya önemli bir kısıtlama getirmiştir. Moleküler baskılama yöntemiyle, proteinler, karbonhidratlar, hormonlar, enzimler ve koenzimler, amino asitler, çeşitli ilaçlar, çeşitli kimyasal ve biyolojik moleküller başarıyla baskılanabilmiştir. Son yıllarda,

biyosensörler üzerindeki biyotanıma yüzeylerinin oluşturulması için moleküler baskılama teknolojisi sıklıkla kullanılan yöntemlerden bir tanesi haline gelmiştir [35].

Moleküler baskılama yöntemi, Şekil 4.1'de özetlendiği gibi seçici moleküler tanıma yeteneğine sahip yüksek ölçüde çapraz bağlanmış polimerleri sentezlemek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem temelde anahtar-kilit uyumuna benzetilebilir. Yani anahtarın işlevini gerçekleştirebilmesi için kilide uygun olması gerekmektedir. Ayrıca enzim-substrat, hormon-reseptör ve antijen-antibadi gibi sadece hedefe, seçilen moleküle uyumlu olmayı gerektiren bir yöntemdir. Böylelikle moleküler baskılama kullanılarak hazırlanan polimerlere dayalı sensörler, seçicilik özelliği kazanmış olur. Moleküler baskılama uygulamalarında amaç, tanıma özelliğine sahip kilidi yani reseptörü sentezlemektir. Bu yöntemde, bir monomerin polimerizasyonu, polimer matrisine dahil edilen hedef molekülün (şablon) varlığında gerçekleşir ve moleküler baskılama süreci, şablonun, fonksiyonel monomerin, çapraz bağlama maddesinin ve başlatıcının bir porojenik çözücü içinde çözülmesiyle başlar ve polimerleşme gerçekleşir. Gerçekleşen polimerizasyon yapıya stabilite katar. Çapraz bağlayıcı olarak genellikle; p-divinilbenzen, etilenglikol dimetakrilat (EGDMA), N,N'-metilen bisakrilamid, 2,6-bisakriloamidopiridin ve trimetilpropan kullanılır ve baskılanmış polimerlerde kalıcı gözenekli yapı elde etmek için çapraz bağlayıcı seçimi önemlidir. Fonksiyonel monomerlerin seçiminde şablon molekülü ile etkileşime gireceği göz önüne alınarak seçim yapılır ve böylelikle moleküler tanıma başarısı için kararlı bir şablon monomer kompleksi oluşturulur. MIP sentezinde en çok kullanılan fonksiyonel monomerler; metakrilik asit (MAA), metakriloamidoglutamik asit (MAGA), ikatonik asit, 2-hidroksimetilmetakrilat (HEMA), metakrilamid, 4-vinilpiridin, p-vinilbenzoik asittir. Monomerler, şablonun etrafında mekansal olarak konumlandırılır ve konum, çapraz bağlanan monomerler ile kopolimerizasyon yardımıyla sabitlenir. Elde edilen polimer, şablonun tamamlayıcısı olan üç boyutlu bir yapıya sahip mikro boşlukları olan makro gözenekli yapıda bir matristir. Böylece, şablon üzerinde şekil olarak tamamlayıcı olan bağlanma bölgelerinin oluşturulması, kalıp moleküllerinin polimerden çözücüyle yıkanarak çıkarılmasıyla gerçekleşir. Sonuç olarak, ortaya çıkan polimer, seçici olarak şablon moleküllerini tanıyabilir ve bağlanma bölgelerinden bağlanır. Bağlanma

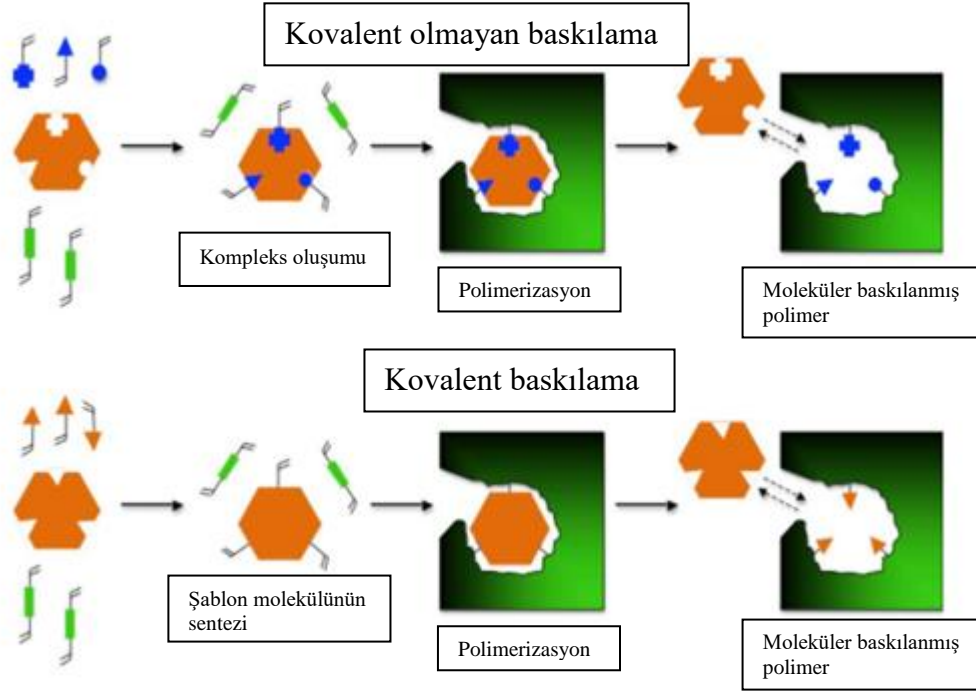
bölgeleri, polimerizasyon sırasında kurulan etkileşimlerin farklı özellikler göstermesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir [36].



Şekil 4.1: Moleküler baskılama yöntemi [37].

Potansiyel tanıma bölgelerine sahip MIP ağları elde etmek için, monomer ve şablon arasındaki etkileşimin iyi olması gerekmektedir. MIP teknolojisi için şablon ve monomer arasındaki ön polimerizasyon etkileşimlerinin doğasına bağlı olarak iki temel yaklaşım kullanılmaktadır:

1. Hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri, iyon veya hidrofobik etkileşim ve metal koordinasyonları gibi Şekil 4.2’de anlatılan kovalent olmayan kuvvetleri kullanan biyolojik tanıma sistemlerine benzer şekilde kendi kendini birleştirme yaklaşımı [38];
2. Geri dönüşümlü kovalent bağlar kullanan ve homojen dağılımlı bir bağlanma alanı sağlayan ve spesifik olmayan bölgeleri azaltan, öncelikli yaklaşım diğer bir yöntem olarak öne çıkmaktadır [39]. Kovalent bağlar kurulmasıyla oluşan moleküler baskılanmış polimerlerin oluşma süreci de Şekil 4.2’de ifade edilmektedir.



Şekil 4.2: Moleküler kovalent ve kovalent olmayan baskılama sürecinin şematik gösterimi [40].

4.1 Moleküler Baskılı Polimerlerin Temel Kompozisyonu

Moleküler baskılı polimer hazırlanırken kullanılan karışımda bir şablon (hedef molekül), fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı monomer, porjen ve başlatıcı olmalıdır. Baskılı polimerin şablon için hafızaya sahip olup olmadığını belirlemek için moleküler baskılı polimer ile referans polimerin performansları karşılaştırılabilir [41].

4.1.1 Şablon

Şablon molekülü, en az bir fonksiyonel grup içermelidir çünkü ayırt edici üç boyutlu yapıya sahip fonksiyonel grup ile etkileşime girmesi şablonun taşınması gereken en önemli özelliktir.

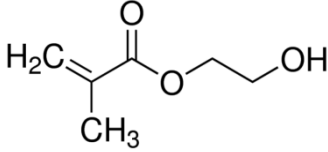
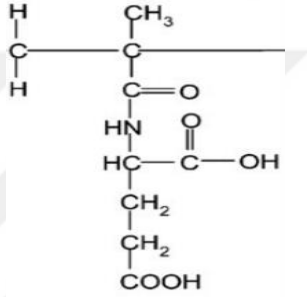
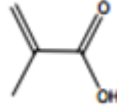
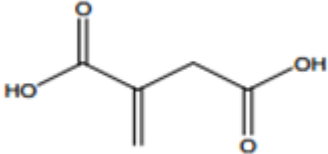
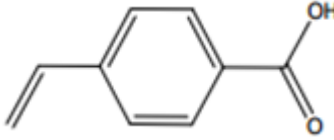
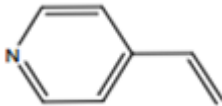
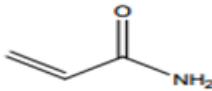
4.1.2 Fonksiyonel monomer

Fonksiyonel monomerler, şablon ile kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle kompleks bir yapı oluşturabilecek fonksiyonel gruplar elde edilmesinde temel rol oynar.

Moleküler baskılama yönteminde en çok tercih edilen monomerler, metakrilik asit (MAA), metakriloamidoglutamik asit (MAGA), akrilik asit (AA), 2-veya4-

vinilpiridin (2- veya 4-VP), akrilamid, triflorometakrilik asit ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) içerir. En az bir vinil grubu ve şablonla etkileşime girebilecek başka bir fonksiyonel grup fonksiyonel monomeri oluştur [42]. Kovalent olmayan baskılamada en çok tercih edilen fonksiyonel monomerler Çizelge 4.1’de verilmiştir.

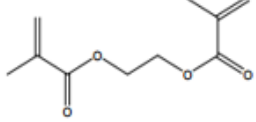

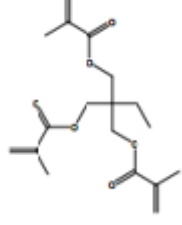
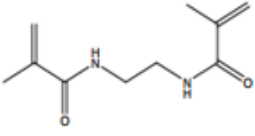
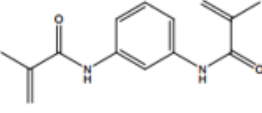
Çizelge 4.1: Kovalent olmayan baskılama için ortak fonksiyonel monomerler [43].

Fonksiyonel Monomer	Yapısı
2-hidroksietil metakrilat (HEMA)	
Metakriiloamidoglutamik asit (MAGA)	
Metakrilik asit	
İtakonik asit	
4-vinilbenzoik asit	
4-vinilpiridin	
Akrilamid	

4.1.3 Çapraz bağlayıcı madde

Çapraz bağlayıcı monomerdeki çoklu vinil grupları polimerize olurken farklı polimer zincirlerinden, iki radikal merkezi birbirine bağlayacak şekilde fonksiyonel monomerlerle birlikte polimerize olduklarından katı ve gözenekli bir yapıya sahiptir. Şablon molekülleri bu gözenekli yapı sayesinde baskılı boşluklardan rahatlıkla içeri girip çıkabilir. Polimerin katı yapıda olmasının sağladığı avantaj ise baskılı boşlukların yapısal bütünlüğünü korumaktır. Moleküler baskılı polimerin sertliğinin ve seçiciliğinin belirlenmesinde çapraz bağlanma derecesi büyük önem taşır. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlanma monomerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2: Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlanma monomerleri [44].

Çapraz Bağlayıcı Monomer	Yapısı
Etilen glikol dimekrilat (EGDMA)	
Divinilbenzen (DVB)	
Trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM)	
N,N-etilenbimetakrilamit (EBMAA)	
N,N-1,3-fenilenbis(2-metil-2-propenamit) (PBMP)	

4.1.4 Porojen

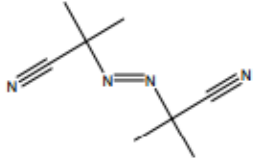
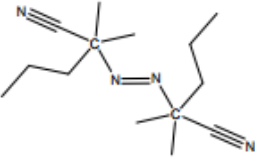
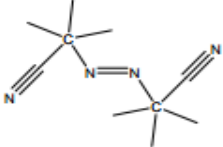
Polimerizasyon aşaması için porojenik çözücü ve hazırlanışı önemli bir etkidir çünkü porojen olarak görev yapmasının yanı sıra solvent olarak da görev yapar.

Şablon ile fonksiyonel monomerler arasındaki bağlanma mukavemeti, polimerin morfolojisi ve özellikleri, özellikle kovalent olmayan etkileşimlerde projene bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Toluen, asetonitril ve kloroform gibi aprotik ve düşük polar organik çözücüler genellikle kovalent olmayan polimerizasyon işlemlerinde, verimli bir baskılama elde etmek için kullanılan projenlerdir [45].

4.1.5 Başlatıcı

Polimerizasyon sürecini, bir serbest radikal kaynağı sağlayarak başlatan madde başlatıcıdır. Azobis (nitril) veya peroksitlerin termal veya fotolitik ayrışmasıyla elde edilebilirler. Çizelge 4.3'te moleküler baskılama için yaygın olarak kullanılan başlatıcılar ve yapıları verilmiştir.

Çizelge 4.3: Moleküler baskılama için yaygın olarak kullanılan başlatıcılar [46].

Başlatıcı	Yapısı
2,2'-Azobis(izobütronitril) (AIBN)	
2,2'-Azobis(dimetilvaleronitril) (ABVN)	
2,2'-Azobis(2-metilizobütronitril) (AMBN)	

4.2 Moleküler Baskılama Teknikleri

Moleküler baskılama tekniği, biyosensörler üzerine moleküllerin baskılanmasının yapılabilmesi için temel olarak yığın baskılama, yüzey baskılama ve epitop baskılama olarak üç gruba ayrılır [47].

4.2.1 Yığın baskılama

Şablon molekülünün bir bütün olarak polimer matris üzerinde baskılanması ve polimerizasyondan sonra da moleküler olarak baskılanmış malzemeden tamamen çıkarılması prensibine dayanarak gerçekleştirilen baskılama çeşididir. Yığın olarak

oluşturulan polimerler küçük parçacıklar oluşturmak amacıyla mekanik olarak ezilir ve böylelikle daha küçük parçalara ayrılır. Bu süreç malzemeye kolay erişilebilirlik, şablona özgü 3D etkileşim alanları ve seçicilik gibi özellikler katar [48]. Özellikle küçük moleküllerin baskılanmasında, şablon molekülünün serbest bırakılmasının ve adsorpsiyonunun daha hızlı ve geri dönüşümlü olmasından dolayı yığın baskılama metodu tercih edilir. Ayrıca, baskılı parçanın tekrar kullanılabilir olması, çeşitli uygulamalar için bu tekniği avantajlı hale getirmektedir [49].

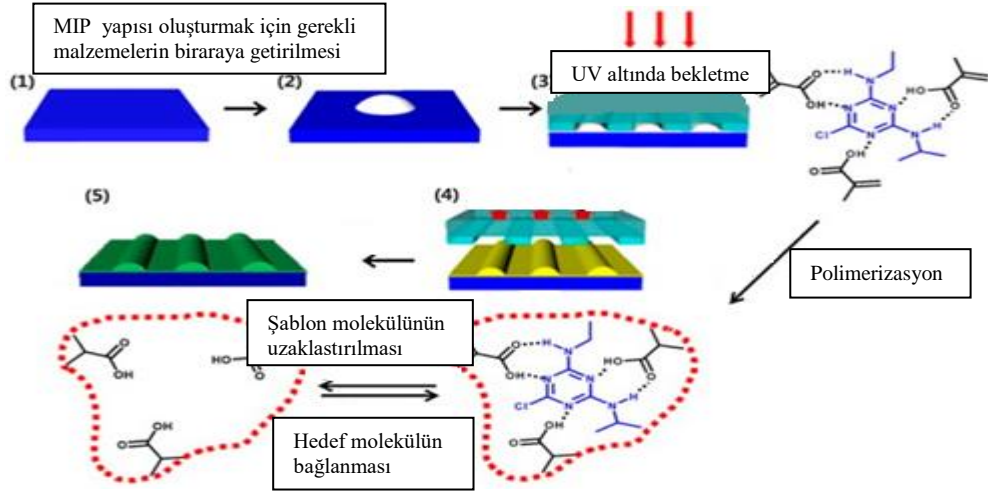
4.2.2 Yüzey baskılama

Yüzey baskılama yönteminde, yüksek afiniteli tanıma alanları bir substratın yüzeyinde oluşturulur [50]. Uygun bağlayıcı kinetiklerin varlığı ise tanıma alanlarına erişimi kolaylaştırır. Şablon ve polimer arasındaki etkileşimler, yığın baskılamada olduğu kadar sınırlı difüzyon özelliği taşımaz [51]. Bu yöntemde, şablon sadece yüzey kaplama aşamasında kullanıldığından baskılama yapılırken diğer yöntemlere göre daha az şablon molekülüne ihtiyaç duyulur [52]. Bu gibi avantajlara sahip olması, biyomoleküllerin ve protein gibi yapıların baskılanmasında bu tekniğin yaygın ve popüler olarak kullanılmasına neden olmaktadır.

4.2.2.1 Yumuşak litografi

Yumuşak litografi veya damgalama, özellikle mikro ve nano ölçekli modellerin hazırlanmasında, pahalı ve özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmadan ve yüzey baskılama tekniği kullanarak sensörlerin oluşturulmasını sağlayan bir yöntemdir [53]. Yumuşak litografi ve UV polimerizasyonu ile MIP filmlerin üretim süreci Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Mikro ve nano boyutlu morfoloji, öncelikle şablon moleküllerinin moleküler baskılanmış yapıdan çıkarılmasını daha sonra da hedef moleküllerin bu boşluklara tutunabilirliğini etkiler. Ayrıca moleküler baskılama yapılan tabakanın kalınlığı da sensörün çalışmasını etkileyen bir faktördür çünkü sensörde oluşturulan bağlanma bölgelerinin sayısı bu tabakanın kalınlığı ile orantılı olarak değişkenlik göstermektedir.

Bu yöntemde dönüştürücü yüzeyine önceden polimerleştirilmiş bir tabaka kaplanarak şablon damgası belirli bir süre yüzeye bastırılarak bekletilir. Böylelikle oluşturulan yüzey baskılı filmlerin oldukça özgül ve seçici olması sağlanır.



Şekil 4.3: Yumuşak litografi ve UV polimerizasyonu ile MIP filmlerin üretim sürecinin şematik gösterimi [54].

4.2.2.2 Şablon immobilizasyonu

Bu yöntem, literatüre 1999 yılında Shi ve arkadaşları tarafından girmiştir [55]. Şablon immobilizasyonu, şablon molekülünün katı bir destek üzerine kimyasal bağlantılarla sabitlenmesiyle daha iyi baskılı yüzeyler elde edilmesini sağlar [56].

4.2.2.3 Aşılama yoluyla yüzey baskılama

Bu yöntemde şablon, polimerizasyon sürecinde mevcuttur. Yani, önceden destek yüzeyine aşılansmış olan polimerik fonksiyonel gruplarla şablonun adsorpsiyonu veya eklenmesi gerçekleştirilir [49]. Daha yüksek analit hareketliliği, polimerin şeklinin ve morfolojisinin daha iyi kontrol edilebilmesinin sonucu olarak daha hızlı kütle transferi ve afinite etkileşimleri bu yöntemin avantajlarıdır.

4.2.2.4 Emülsiyon polimerizasyonu

Yüzey baskılama yöntemlerinden bir tanesi olan emülsiyon polimerizasyonunda, çekirdek parçacıklar sentezlendikten sonra baskılı yapıyla kaplama gerçekleştirilir [56].

4.2.3 Epitop baskılama

Epitop baskılama yönteminde istenmeyen bağlanmalar en aza indirilebilir ve afinite artırılabilir. Bu da bir makromolekülün küçük bir parçası kullanılarak daha özel ve güçlü etkileşimlerin ortaya çıkmasıyla elde edilir. Böylelikle de tüm yapıyı tanıma yeteneğine sahip baskılanmış polimerler elde edilir [53].

4.3 Yük Transfer Direnci

Yük transfer direnci, kinetik kontrollü, karışık bir potansiyele sahip olmayan, dengede tek bir elektrokimyasal tepkime ile oluşur.

Yük transferi, sıcaklık, tepkime türü, tepkime ürünlerinin derişimi ve potansiyeline bağlı olarak belli bir hıza sahiptir [57].



5. İMPEDİMETRİK BİYOSENSÖR UYGULAMALARINA AİT LİTERATÜR ÖZETİ

Biyosensör alanındaki son teknolojik gelişmeler, akışkanlar (kan, vücut sıvısı veya çözelti) üzerinde yapılacak olan uygulamalar için algılama platformlarının küçültülerek daha işlevsel hale getirilmesine olanak sağlamıştır. Elektronik, sensör teknolojileri ve akışkan uygulamalarının birleşmesiyle meydana getirilen, dilimize çip-üstü-laboratuvar olarak geçirilen bu küçük cihazlar (LOC), birçok analitin çoklu bir şekilde gerçek zamanlı olarak ölçümünün yapılmasını sağlar. Günümüzde hastalık belirteçleri, laboratuvarlarda bulunan cihazlar aracılığıyla tespit edilir ya da miktarları ölçülür ve sonuçlanması için belirli bir zamana ihtiyaç duyulur. Çip-üstü-laboratuvar olarak adlandırılan yeni nesil biyosensörler, hızlı, kullanıcı dostu, düşük maliyetli, az miktarda sıvının ölçüm için yeterli olduğu ve gerçek zamanlı ölçüm yapılmasına olanak sağlayan cihazlardır. Bu çipler, mikroüretim teknikleri, sistem otomasyonu, yarı iletken ve mikroakışkan teknolojilerini birleştirerek, küçük miktarlardaki vücut sıvılarını analiz edebilirler [58-60]. Yüksek hassasiyet ve seçicilik, kısa analiz süresi ve küçültülebilme imkanına sahip olması ile biyosensörlerin tasarlanması için elektrokimyasal yöntemler yaygın olarak kullanılır.

Bir sinir ajanı olarak bilinen Sarinin hızlı elektrokimyasal tespiti için üretilen çip üstü laboratuvar cihazının tasarlanmasında Tan ve ark. (2013) amperometrik tabanlı bir yaklaşım kullanmışlardır. Bu çalışmada, mikroakışkan çip üzerinde, entegre serigrafi baskılı elektrot (SPE) kullanılarak, su örneğinde eser miktarda Sarinin tespitinin yapılması amaçlanmıştır. Üretilen biyoçipte kullanılan, kobalt ftalosiyanın ile modifiye edilmiş SPE sayesinde 1 nM'a kadar düşük derişimli Sarinin tespiti başarılı şekilde yapılmıştır. Amperometrik yöntemle elde edilen çıkış akımları çözeltideki tiokolin iyonlarının derişimiyle ilişkilidir. Sabit bir tepkime süresi içinde oluşan son ürünlerin miktarının ölçülmesiyle asetilkolinesteraz enziminin (AChE) aktivitesi belirlenir. Cihaz temel olarak, SPE'nin yerleştirildiği, sıvının verildiği ve asetilkolinesteraz enziminin sabitlendiği bölmelerin alt malzemesi polimetilmetakrilat (PMMA) olan mikroakışkan yapı üzerine bağlanmasıyla oluşur.

Böylelikle enzimin aktivitesi, meydana gelen tiokolin iyonlarının amperometrik olarak ölçülmesiyle belirlenmiştir. Bu çalışmada amperometrik yöntemle yapılan tespit ile optik yöntemle yapılan tespit karşılaştırılmış ve elektrokimyasal yöntemin daha hassas olduğu belirlenmiştir [61].

Selvam ve ark. (2017) geliştirdikleri, empedansa dayalı ölçüm yapan, POC biyosensör cihazı sayesinde lupus teşhisi için vasküler hücre adhezyon molekülü-1 tespitinin invazif olmayan bir yolla yapılmasına olanak sağlamıştır. Bu cihaz, 50 µL idrar ile 15 dakikada içinde vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1)'in tespitini yapar. İmmünoassay ve hedef biyobelirteçlerin bağlanması elektrokimyasal empedans immunoassayı ile ölçülerek eşdeğer bir devre ile ilişkilendirilmiştir. Geliştirilen bu LOC biyosensörünün saptama aralığı 8 fg/mL-800 pg/mL olarak belirlenmiştir. Tasarlanan sensör temel olarak 2 parçadan oluşmaktadır. Birinci parça üzerine altın mikroelektrotların yerleştirildiği baskı devre FR-4 kartı, ikinci parça ise polidimetilsiloksan (PDMS) ile üretilen bir mikroakışkan örnek odacıdır. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen bağlanmaların meydana getirdiği empedans değişimi, elektrokimyasal empedans spektroskopisi kullanılarak ölçülmüştür. Elektrokimyasal karakterizasyon için mikroelektrotlar ticari potansiyostata lehimlenerek bağlanmış ve EIS ve CV ölçümleri yapılmıştır. Bu çalışmada üretilen biyosensör çipi 8 fg/mL-800 pg/mL derişim aralığında, derişimle orantılı olarak 320-900 Ω arasında doğrusal empedans değişikliği göstermiştir. 12 hastadan alınan idrar, biyosensör çipinin performansı ve doğruluğunu test etmek amacıyla ELISA testiyle de ölçülmüş ve karşılaştırılarak sonuçların birbirine çok yakın olduğu gözlemlenmiştir [62].

Uludağ ve ark. (2016) yaptıkları çalışma sonucunda hastalık biyobelirteçlerinin algılanmasına yönelik otomatik ve entegre çip temeline dayanan laboratuvar temelli bir cihaz geliştirmişlerdir. Bu cihaz prostat kanserinin teşhisinde kullanılan prostat spesifik antijen (PSA) seviyesinin saptanmasına olanak sağlamaktadır. Amperometrik ölçüm temelli MiSens olarak isimlendirilen cihaz entegre ve tam otomatik elektrokimyasal biyosensör olarak tasarlanmış ve üretilmiştir. Bu biyoçip, silikondioksit plaka üzerinde 2 elektrot dizisinden oluşmaktadır. Her elektrot dizisi 3 tane çalışma elektrodu, 1 tane referans elektrot ve 1 tane de yardımcı elektrottan oluşacak şekilde tasarlanmıştır. Geliştirilen bu prototip, küçük ve taşınabilir olmasının yanı sıra düşük örnek hacmiyle (7 µL) kolayca çalıştırılabilir ve yanıt süresi de kısadır. Alınan hasta örnekleri, MiSens cihazıyla test edilmiş ve sonuçlar

hastanede yapılan test ile karşılaştırılmıştır. MiSens çipinden elde edilen sonuçların hastanede yapılan test ile yakın sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, MiSens cihazının çip üstü laboratuvar olarak potansiyel kullanıma sahip olduğunu göstermiştir [63].

Empedans değişiminden faydalanılarak geliştirilen bir diğer çip üstü laboratuvar cihazı sayesinde Brazey ve ark. (2018) entegre konum sensörü kullanarak bir boncuğun yerini gerçek zamanlı olarak saptamayı başarmışlardır. İlgili çalışmada hücrelerin konumu, iki elektrot arasında yapılan empedans ölçümlerine dayanarak elde edilir. Burada kullanılan sensör çipe entegre edilmiştir ve konuma duyarlı bir şekilde empedans algılar. Çip ve elektrotlar tasarlanırken hassasiyet ve tekrarlanabilirlik oranı artırılmış ayrıca gerçek zamanlı algılama sorununu gidermek için genişletilmiş Kalman filtresi kullanılmıştır. Yapılan çalışmada 8,7 µm çaplı boncukların uzunlamasına konumunun bir kanalda belirlenmesi için deneysel çalışmalar yapılmıştır. Deneysel düzenek, hareketi sağlayan bir yapı ve algılama birimi içeren mikroakışkan bir çipten oluşmaktadır. Ayrıca mikroakışkan çip üzerinde elektrotların bulunduğu bir tabaka ve mikroakışkan kanal yer alır. Ölçüm yapılacak olan elektrotların beslemesi için frekansı 500 kHz olan, 1,6 V_{pp} AC sinyali kullanılmıştır. Ölçüm elektrotları arasındaki empedansı ölçmek için bir ön yükseltecin ardından sinyalleri filtrelemek için faz kilitlemeli yükselteç kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, iki elektrot arasındaki empedansın ölçülmesi temeline dayanan, tek bir akış yönü boyunca mevcut konumu bulmaya yönelik tasarlanmış bir çip üstü laboratuvar cihazı geliştirilmiştir [64].

Yapılan bu çalışmalarda elektrokimyasal yöntem olarak amperometrik ölçüm tekniği tercih edilirken, Uygun ve Dilgin (2013) yaptıkları çalışmada impedimetrik ölçüm tekniğini kullanmışlardır. Bu çalışmada, klorpirifozun (CPF) küçük miktarlardaki seviyesinin belirlenmesi için polipirrolün elektropolimerizasyonu ile klorpirifozun varlığında kalem grafit elektrot üzerine moleküler olarak baskılanmasıyla impedimetrik biyosensör geliştirilmiştir. CPF'nin polipirrola karşı bağlanma performansı elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) yöntemi kullanılarak incelenmiş, baskılı elektrodun yüzeyi de taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Elektrokimyasal analiz yapılırken çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl/KCl_{doy} ve yardımcı elektrot olarak platin tel olmak üzere, 3'lü elektrot sistemi kullanılmıştır. Empedans

ölçümlerinin sonuçları ele alındığında moleküler baskılanmış kalem grafit elektrot ile CPF tespiti yapabilen düşük maliyetli, seçici ve duyarlı elektrokimyasal bir sensör geliştirildiği görülmüştür. Sonuç olarak 20-300 μgL^{-1} arasında CPF tespiti için doğrusal bir tepki aralığına sahip olan impedimetrik biyosensör geliştirilmiştir [65].

Albayrak (2014) yaptığı yüksek lisans tezinde triptofana duyarlı moleküler baskılanmış p[HEMA–MMA] üzerinde impedimetrik biyosensör geliştirmiştir. Bu tez çalışmasında camsı karbon çalışma elektrotu, yüzeyine moleküler baskılama yöntemiyle triptofanın baskılanmasıyla hazırlanmıştır. Ölçümler 3'lü elektrot sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sulu ortamlarda analiz yapılırken $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{doy}}$, kuru ortamlarda analiz yapılırken ise Ag/AgNO_3 elektrotları referans elektrot olarak kullanılırken, yardımcı elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Baskılamadan önce ve sonra dönüşümlü voltametri yöntemiyle yüzeylerin karakterizasyonu yapılmış, elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile de triptofanın tespiti için kalibrasyon eğrisi çıkarılarak en uygun şartlar belirlenmiştir. Ayrıca X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile elektrotların yüzeyleri karakterize edilmiş, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile de elektrot yüzeylerinin morfolojisi incelenmiştir. Triptofan tespiti için hazırlanan modifiye bir yüzeyin kullanılabilirlik sayısı en az 50 olarak belirlenmiştir [66].

Kanserin erken teşhis edilmesine yardımcı olan HER3 biyobelirtecinin tayini için tasarlanan anti-HER3 bazlı biyosensör Şimşek (2012) tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışmada, çalışma elektrodu olarak 2.01 mm^2 yüzey alanlı altın elektrot, yardımcı elektrot olarak 10 mm uzunluğunda platin tel ve referans elektrot olarak Ag/AgCl kullanılmıştır. Dönüşümsel voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemleriyle immobilizasyon basamakları ve elektrot yüzeyine tutunma incelenmiş aynı zamanda empedans verileri eşdeğer devreye aktararak empedans ve kapasitans değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen empedans ölçümleri üzerinde Kramers-Kronig dönüşümü uygulanmıştır. Bu yüksek lisans tez çalışması sonucunda HER3 tayini yapabilen elektrokimyasal biyosensör sistemi geliştirilmiştir [67].

Chornokur ve ark. (2011) geliştirmiş oldukları empedansa dayalı biyosensör sayesinde prostat kanserinin belirteci olarak kullanılabilen prostat özellikli antijenin (PSA) standart bir çözelti içinde ve insandan alınan vücut sıvısında tespit edilmesine olanak sağlamıştır. Sensör fotolitografik yöntem kullanılarak üretilmiştir ve yakalama antikoru olarak PSA tanıyabilen monoklonal antikolar kullanılmıştır.

Bağlanmayı tespit edebilmek için elektrokimyasal empedans spektroskopisi kullanılmıştır. PSA için tespit limiti 1 pg/mL olarak ölçülmüş ve bunun da piyasada yapılan diğer analizlerle karşılaştırıldığında daha küçük bir miktar olduğu belirlenmiştir. Biyosensör çipi fotolitografik teknik kullanılarak 4" oksitlenmiş silikon tabaka üzerinde üretilmiştir. 1 pg/mL-10 ng/mL arasında değişen derişimlerde PSA'nın ölçümü, ilk olarak PBS (pH 7.4) içinde yapılmıştır. Buradan elde edilen veriler kullanılarak, PSA'nın insandan alınan örnekte tespiti yapılmıştır. Oluşturulan biyoelektrot 1 pg/mL ile 100 pg/mL aralığında lineer bir davranış sergilemekte ve üretilen biyosensör sayesinde analizin tamamlanması 45 dakika sürmektedir [68].

Ege Üniversitesinde yapılan bir yüksek lisans tez çalışmasında, influenza A virüsünün tanısına yönelik elektrokimyasal bir DNA biyosensörü tasarlanmıştır. Dizilerin, tek kullanımlık kalem grafit elektrotların üzerine tutturulması için ıslak adsorpsiyon yöntemi kullanılmıştır. Elektrotların aktivasyonu asetat tampon çözeltisi içinde 60 sn boyunca +1.4 V gerilim uygulanmasıyla gerçekleşmiştir. Voltametrik ölçümler için asetat tampon çözeltisi (pH 4.8) kullanılırken impedimetrik ölçümler için $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4}$ içeren fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) kullanılmıştır. Elektrot yüzeyine tutunması beklenen hedef ve rastgele dizi derişimleri artırılarak (3-5-7-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) elde edilen yanıtlar incelenmiş ve ölçülebilecek optimum derişim 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, elektrot yüzeyinin kaplanma süresinin ölçümleri etkileyebileceği düşünülerek 5, 10, 15, 20 ve 30 dakikalık farklı sürelerde elektrotların kaplanması sağlanarak en uygun kaplanma süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir. Böylelikle, ilgili tez sonucunda, influenza A virüsünün teşhisinde kullanılabilen elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. [69].

Soraya ve ark. (2017) insan dışkısında hemoglobin proteininin kantitatif tespitinin yapılmasına olanak sağlayan, yüzey optimizasyonlu birbirine bağlı elektrotların (IDE) yer aldığı bir biyosensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen elektrokimyasal biyosensör çipinde yer alan birbirine bağlı elektrotlara (IDE) anti-hemoglobin antikörünün immobilizasyonu yapılmış ve dışkıda bulunan hemoglobinin bağlanmasına olanak sağlanmıştır. Hemoglobin proteininin bağlanmasıyla cihazın empedansında değişiklik meydana gelmekte ve buna bağlı olarak hemoglobinin derişimi tespit edilebilmektedir. Kullanılacak olan çipte yer alan mikroskobik cam katmanlar Cr ve Au ile kaplanarak, mikroelektrot dizisinin oluşturulması için lazer

ablasyon sistemiyle şekillendirilmiştir. Cihaz işlevsel hale getirilmeden önce oksijen serum ile işleme sokularak iyileştirilmiştir. IDE sensörü bir direnç ve ona paralel kapasitör şeklinde modellenmiştir ve R_{ref} 1 k Ω olacak şekilde IDE sensörüne seri olarak bağlanmıştır. Devre fonksiyon jeneratörü kullanılarak 100 Hz, 1 kHz ve 10 kHz frekanslarında, V_{pp} 100 mV olan bir sinüs dalgasıyla uyarılmıştır. Referans olarak kullanılan direnç üzerinden faz kilitlemeli yükselteç ile hemoglobin bağlanmadan önce ve bağlandıktan sonra oluşan V_0 gerilimi ölçülmüştür. Ayrıca farklı frekanslarda genlik ve V_0 geriliminin faz değişimini hemoglobinin değişen derişimlerine karşılık değerleri kaydedilerek analiz edilmiştir. Hemoglobin derişiminin ayırt edilmesinde kullanılabilecek en uygun frekansı belirlemek için, uygulanan her frekans değerinde Kruskal-Wallis analizi yapılmıştır. İlgili çalışma sonucunda, 10 $\mu\text{g.Hb/g}$ dışkı kadar düşük derişimlerde ölçüm yapılabilmektedir. Sonuç olarak, elektrokimyasal empedans spektroskopisi kullanılarak dışkı örneklerinde hemoglobin derişiminin kantitatif olarak ölçülmesini sağlayan biyosensör çipi üretilmiştir [70].

5.1 Küçük Moleküllerin İmpedimetrik Biyosensör Kullanılarak Tespiti

Biyosensörler, proteinler ve oligonükleotitlerden küçük moleküllere kadar birçok analitin tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküllerin hassas ve seçici tespiti biyomedikal araştırmalarda özellikle hastalık teşhisinde önemli rol oynamaktadır. DNA, protein, küçük moleküller gibi yapıların tespiti, ölçümü ve analizi, moleküler olarak baskılanmış polimerler, aptamerler ya da antikorlarla oluşturulan biyomimetik sensörler kullanılarak gerçekleştirilen ve elektrokimyaya dayanan impedimetrik ölçümler sayesinde rahatlıkla yapılabilir [71]. Biyosensörler oluşturulurken esas alınan impedimetrik ölçümlerin çok çeşitli uygulamaları mevcuttur. DNA saptama ve analizi [72-74], tanınmış trombin aptamerinin tespiti [75], potasyum iyonlarının saptanması [76] ve etanolamin gibi küçük moleküllerin [f] ve Salmonella tifimuryum gibi tam hücrelerin [77] belirlenmesi impedimetrik elektrokimyasal yöntemle mümkündür. Vücut fonksiyonlarının yerine getirilmesinde önemli rol oynayan ve küçük bir molekül olan kolinin elektrokimyasal yöntemle analizi üzerine yapılan çalışma incelendiğinde üç farklı derişimde kolinin, elektrot yüzeyine MIP yöntemiyle baskılanmasının ardından RdxPBS çözeltisi içinde kolin tespiti yapıldığı görülmüştür [78]. Baskılanan üç farklı derişimin, kolin tespitinde

yetersiz kaldığı görülmüş ve bu çalışmada elektrot yüzeyine baskılanan derişim arttırılarak etkili bir şekilde kolin tespiti yapılmıştır.

Literatürde yer alan küçük moleküllerin impedimetrik biyosensör kullanılarak tespitine yönelik benzer çalışmalara örnek olarak aşağıdakiler verilebilir.

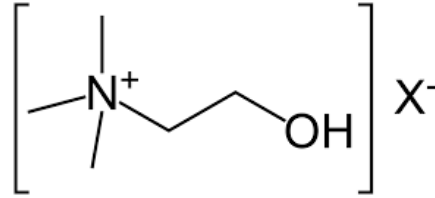
Nguy ve ark. (2017) yaptıkları çalışma sonucunda prostat kanserinin belirteci olan aminoasit sarkosinin tespit edilmesinde kullanılabilir bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensör kullanılarak sulu tampon çözeltileri içinde 1 nM'nin altında bir tespit limitine ulaşılmıştır. İlgili çalışmada, MIP sentezi için sentezlenmiş altın nanopartiküller serigrafi baskılı karbon elektrotun (SPCE) modifiye edilmesinde kullanılmıştır. Elektrot yüzeyindeki polimerin morfolojisinde meydana gelen değişiklikleri gözlemek için elektrokimyasal empedans spektroskopisinin bir metodu olan, elektrot ve çözelti arayüzündeki iletkenlik ve dielektrik gibi çeşitli deneysel parametrelere karşı duyarlılık gösteren empedans yanıtı kullanılarak yüksek tekrarlanabilirlik ve stabiliteye sahip impedimetrik biyosensör geliştirilmiştir [79].

Benzer bir çalışmada Radhakrishnan ve ark. (2014) iletken ve biyoyumlu bir elektrot üzerine tespit edilecek molekülün sabitlenmesi ve sonrasında elektrot yüzeyine analitin bağlanarak empedansında meydana getirdiği değişimin ölçülmesine dayanan bir biyosensör geliştirmişlerdir. Elektriksel yapısından, optik ve akustik yöntemlerdeki gibi çeşitli bileşenler içermemesinden dolayı, empedans biyosensörleri diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında çeşitli avantajlar sağlar. Ayrıca basit ve taşınabilir biyosensörler olması kullanım potansiyelini arttırmaktadır. İlgili çalışmada, endokrin bozucu iki kimyasal olan norfluoksetin ve BDE-47'nin tespiti için impedimetrik biyosensör geliştirilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler yapılırken 3'lü elektrot sistemi kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada, Ag/AgCl elektrotu referans elektrot olarak, platin spiral yardımcı elektrot olarak ve altın elektrot çalışma elektrotu olarak yer almaktadır. Elektrokimyasal ölçümler 7.4 pH derecesine sahip fosfat tampon çözeltisi (PBS) içinde yapılmıştır. Altın çalışma elektrotu, 0.19 cm² 'lik elektrot alanı ve 6 mL'lik hücre hacmiyle, içine n-tipi dejenere silisyum (111) gömülmüş saf teflondan yapılan elektrokimyasal hücre üzerindeki O-halkası ile sabitlenmiştir. Oluşturulan bu tabaka kullanılarak, meydana gelen empedans değişimleri ölçülmüş ve norfluoksetin için 8.5 ng/mL, BDE-47 için 1.3 ng/mL saptama sınırları elde edilmiştir. Böylelikle, bu yöntemle nispeten küçük organik moleküller daha hassas ve seçici bir şekilde tespit edilebilmiştir [80].

5.2 Küçük Molekül Olarak Kolin Kullanımının Önemi

Kolin, tüm yaş grupları için önemli, suda çözünebilen vitamin benzeri temel bir besin maddesidir. “Vitamin benzeri” olarak insan vücudunda sentezlenebilir, fakat işlevini doğru bir şekilde sürdürebilmesi için besin takviyesi gereklidir.

Kolin, kimyasal formülü $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_2\text{OHX}^-$ (sağdaki X, tanımlanmamış bir anyonu ifade eder) olan, N,N,N-trimetiletanolamonyum katyonunu içeren, kuaterner amonyum tuzlarının sınıfını ifade eden ve IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) ismi 2-hidroksi-N,N,N-trimetiletan-1-aminyum olan bir maddedir [81].



Şekil 5.1: Kolinin Yapısal Formülü [82].

Kolin, hem yetişkinler hem de bebekler için beyin gelişimi ve hafıza fonksiyonunda önemli rollere sahip, aynı zamanda, merkezi sinir sistemi gibi vücuttaki sayısız metabolik fonksiyonu korumakta görevli bir maddedir. Kolin için günlük alım miktarı, bebeklerde 125 mg olurken 14 yaşından büyük erkeklerde ve emziren kadınlarda, 550 mg'a kadar değişiklik göstermektedir [83]. Alzheimer, parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıklar, artmış prostat, pankreas kanserleri riski, yağlı karaciğer hastalıkları, bazı akciğer hastalıkları, huntington's hastalığı ve otizm gibi hastalıklar anormal kolin metabolizmasıyla ilişkilendirilebilir [84-88]. Bu nedenle kolin miktarındaki değişimin ölçümü, bu hastalıklara teşhis konulmasında kullanılabilen bir parametre haline gelmiştir.

Karbon-11 tip kolin, özellikle kanser görüntüleme için kullanılan bir moleküldür. Kolin, hücrelerdeki fosfolipitlerin sentezi için öncü molekül olarak görev yapar [89]. Bir hücre bölünmek üzere olduğunda, iki yavru hücrenin hücre zarlarını oluşturmak için yeterli materyal üretmek üzere bu fosfolipitleri sentezler. Bu nedenle, yüksek proliferatif tümörlerin, çevre dokuların aldığı kolin miktarından daha fazla kolin alacağı hipotezi öne sürülmüştür. Bu, beyinde kolin tutulumunun başarılı bir şekilde gösterilmesinden sonra beyin tümörlerinde ilk kez test edilmiştir ve beyin

tümörlerinin, çevre beyin dokusundan 10 kat fazla karbon-11 kolin aldıkları bulunmuştur [90].

Kolin fosfolipid metabolizması kanser çeşitlerinde değişiklik göstermektedir. Tümörlerin ve kanser hücrelerinin kolin metabolit profili, fosfokolin ve toplam kolin içeren bileşiklerin yükselmesi ile ifade edilebilir [89].

Analizlerin gerçekleştiği iyonik sıvıların yapısı ve elektrokimyasal özellikleri analizler için önemli rol oynamaktadır. Kolin klorür ve üre bazlı iyonik sıvıların yapısının ve elektrokimyasal özelliklerinin incelendiği çalışmada [91] ilk olarak Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile farklı gruplar arasındaki etkileşimler incelenmiş, yapıları analiz edilmiş ve tanımlanmıştır. EIS analiziyle elektrotların difüzyon ve yük transfer adımları incelenmiştir. İyonik sıvının döngüsel voltametri davranışı ele alınarak elektron transfer kinetiği ve elektron transferinin sonuçları hakkında bilgi edinilmiştir. Böylelikle, iyonik sıvıda ayrışma ürünleri olarak anot ve katotta, klor gazının ve trietilaminin ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Bu durum, iyonik sıvılarda analiz yapılırken analitin bozularak farklı maddelerin oluşmasına neden olabileceği ve bunun da elektrotların EIS ve CV yanıtlarını etkileyeceği söylenebilmektedir [91].

Asetilkolin (ACh) ve kolinin (Ch) tespiti için yapılan elektrokimyasal çalışmaların özetlendiği ve diğer analiz yöntemleriyle karşılaştırıldığı çalışmada asetilkolin için 1 fmol, kolin için 100 amol'a kadar geliştirilen tayin limitlerinin mikroanalitik yaklaşımla elde edildiği görülmüştür [92].

Bu çalışmanın baz alınarak yapıldığı önceki çalışmada [78], elektrokimyasal biyosensör olarak E-1ChMPGE, E-3ChMPGE ve E-5ChMPGE olmak üzere 3 farklı derişimde moleküler baskılanmış elektrotlar kullanılmıştır. Bu elektrotların kolin tanıma bölgelerinin sayısı derişime bağılı olarak farklılık göstermektedir. Elektrot yüzeyinde oluşturulan kolin reseptör sayısının derişimle birlikte artışı, elektrot yüzeyine bağlanan kolinin artışıyla ilişkilendirilebilir. Böylelikle, elektrotlardan elde edilen elektriksel yanıtların da değişmesi beklenmektedir. İlgili çalışmada OCP, CV ve EIS analizleri beş farklı derişimde kolin içeren RdxPBS içinde üç elektrotlu sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PGE'ler üzerindeki kolin tanıma alanlarına çözelti içindeki kolinin bağlanmasıyla, elektrotlar üzerinde beklendiği şekilde akım, gerilim ve empedans değişimleri gözlemlenmiştir. Baskılanan kolin derişiminin

artmasıyla, elektrotların tespit edebildiği kolin derişim aralığı da artış göstermiştir. E-5ChMPGE elektrotunun 71.6 pM-716 pM, E-3ChMPGE elektrotunun 71.6 pM-7.16 nM ve E-1ChMPGE elektrotunun 71.6 pM-71.6 nM aralığında kolin tespiti yapabildiği, bu elektrotlara ait EIS grafiklerinden elde edilen empedans verilerine dayanarak belirlenmiştir. Bu üç elektrotta kolin boşluklarının az olması kolin seçiciliğinin de düşük olmasına neden olmaktadır. Elektrot yüzeyine baskılanan kolin derişiminin artmasıyla kolin seçiciliği ve dolayısıyla ayırıştırma yapılan aralıkta da artış görülmüştür. Polat'ın [78] çalışması 8. Bölümde daha etraflı olarak ele alınarak, bu tez çalışmasının bulguları ışığında tartışılacaktır.

Bu tez çalışmasında ise daha yüksek derişimlerde kolinin tespit edilebilmesi için elektrot yüzeyine baskılanan kolin derişimi arttırılarak analizler yapılmıştır. Ayrıca çözelti içine eklenen kolin derişimi de arttırılarak, MIP bazlı PGE'lerle kolin tayin sınırının genişletilmesi hedeflenmiştir.

6. GEREÇ VE YÖNTEM

6.1 Kullanılan Cihazlar

Elektrokimyasal deneyler, fiziksel elektrokimya, dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi yazılımı içeren ZMAN EIS Veri Analiz Yazılımı ile PC ile arayüzlenen ZIVE SP2 Potensiyostat/Galvonostat Referans 600 (üretim yeri: Güney Kore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrot (PGE), referans elektrot (Ag/AgCl) (doymuş KCl) ve yardımcı elektrot olarak platin telden oluşan üç elektrotlu sistem kullanılmıştır. Referans elektrot (Ag/AgCl) ve yardımcı elektrot olarak kullanılan platin tel Referans Kimya'dan temin edilmiştir. Çözeltileri hazırlamak için kullanılan deiyonize su, Wilo marka (üretim yeri: Fransa) su arıtma sistemleri kullanılarak elde edilmiştir. Yüzey morfolojisini incelemek üzere elde edilen yüzey görüntüleri Düzce Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DÜBİT) bulunan PARK SYSTEMS XE-100E AFM (üretim yeri: Güney Kore) cihazı ile $9.09 \times 9.09 \mu\text{m}^2$ alanın 0.5 Hz tarama hızıyla taranması sonucu elde edilmiştir.

6.2 Kullanılan Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanmaları

6.2.1 Asetik tampon çözeltisi (ABS)

1L Asetik tampon çözeltisi (ABS) (pH 4.8) hazırlamak için 20 mM sodyum klorür (NaCl), 0.1 N sodyum asetat trihidrat ve 0.1 N asetik asit kullanılmıştır. 1.17 gr NaCl, 13.60 gr $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 5.74 mL asetik asit hacmi 1 litre olacak şekilde deiyonize su eklenerek karıştırılmıştır.

ABS çözeltisi elektrotların ön hazırlığında, elektrotları optimize etmek amacıyla kullanılmıştır.

6.2.2 Fosfat tampon çözeltisi (PBS)

1L redoks çözeltisi, PBS (pH 7.4), hazırlamak için 0.137 M sodyum klorür (NaCl), 0.0027 M potasyum klorür (KCl), 0.01 M disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve

0.0018 M potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) kullanılmıştır. Çözelti hazırlanırken 1:5 oranında ölçeklendirilmiştir. 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr Na_2HPO_4 ve 0.24 gr KH_2PO_4 karıştırılmış ve hacmi 1L olana kadar deiyonize su eklenerek homojen bir çözelti hazırlanmıştır. Her elektrodun analizi için, 5 mM, 0.164 gr, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, PBS çözeltisine eklenerek CV ve EIS ölçümlerinin yapılacağı RdxPBS çözeltileri hazırlanmıştır.

6.2.3 Farklı molaritelerde kolin çözeltileri

Farklı mol sayılarında kolin içeren çözeltileri hazırlamak için, ilk olarak, 10 mg kolin 20 mL PBS çözeltisinde çözülerek, stok çözeltisi (Çözelti 1) hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden 200 μL alınıp, 800 μL PBS ilave edilmesiyle Çözelti 2 elde edilmiştir. Bu çözeltilerden 100 μL alınarak 900 μL PBS ilave edilmesiyle Çözelti 3 elde edilmiştir. Çözelti 4 – Çözelti 7'nin hazırlanmasına önceki çözeltilerden 100 μL alınarak ve 900 μL PBS ilave edilmesiyle devam edilmiştir. Bu seyreltme işlemlerinin ardından elde edilen çözeltiler ve isimleri Çizelge 6.1'de verilmiştir.

Çizelge 6.1: Çözeltiye eklenen kolin derişimleri ve isimlendirilmesi.

Çözelti Numarası	İçerdiği Kolin Derişimi (M)	Çözeltinin İsimlendirilmesi
7	7.16×10^{-11}	E-11
6	7.16×10^{-10}	E-10
5	7.16×10^{-9}	E-9
4	7.16×10^{-8}	E-8
3	7.16×10^{-7}	E-7
2	7.16×10^{-6}	E-6

Çözeltiler 10 kat seyreltilerek hazırlanmış ve $2\text{E}-1$ M ile $20\text{E}-1$ M arasında değişen derişimlerde kolinin moleküler baskılanmasıyla elde edilen elektrotların bu çözeltilerdeki tayin aralıkları belirlenmiştir.

6.2.4 Kan örneğinin hazırlanması

Oluşturulan sensörlerin güvenilirliğini ve uygulanabilirliğini göstermek amacıyla kolin baskılı kalem grafit elektrotlar, insan kan serumunda kolin tespit etmek için kullanılmıştır. Bu amaçla Yeditepe Üniversitesi Hastanesi'nde, kan alındıktan hemen sonra 3300 devir/dakika'da GYROZEN 1248R (üretim yeri: Güney Kore) cihazıyla

10 dakika santrifüjlenerek kan serumunun ayrışması sağlanmıştır. Ayrıştırılan serum tüplere alınarak çalışmada kullanılmak üzere -20 °C'de dondurularak bekletilmiştir.

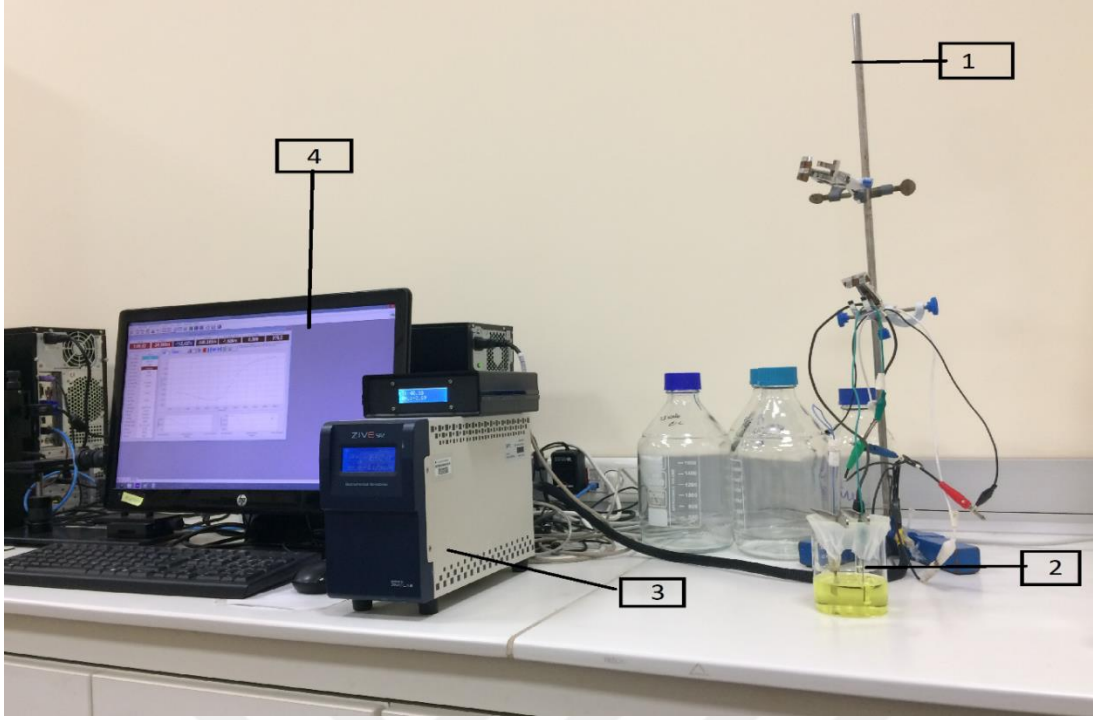
6.3 Deney Düzeneginin ve Elektrotların Hazırlanması

Öncelikle elektrotların moleküler baskılama yapılan uzunluğu, yaklaşık 2 cm olarak işaretlendi ve analiz yapılırken elektrotlar çözelti içerisinde 2 cm batırılarak ölçümler yapılmıştır.

Elektrotların OCP, CV ve EIS ölçümleri, ilk olarak, kolin içermeyen, 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içeren 100 mL hacimde RdxPBS içerisinde yapılmıştır. Daha sonra bu çözeltiye sırasıyla, en seyreltik olandan derişik olan çözeltiye doğru, E-11 M'den başlayarak, hazırlanan kolin çözeltilerinin eklenmesiyle elektrotların ölçümü gerçekleştirilmiştir. E-11 M çözeltinin eklenmesiyle yapılan OCP, CV ve EIS ölçümlerinin tamamlanmasının ardından çözeltiye E-10 M'lık çözelti eklenip, aynı ölçümler tekrarlanmıştır. Bu ölçümler sırasıyla, E-9, E-8, E-7 ve E-6 M çözeltilerin eklenmesiyle, ayrı ayrı bütün elektrotlar için yapıлып, farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerde elektrotların davranışı incelenmiştir.

6.3.1 Deney düzenegi

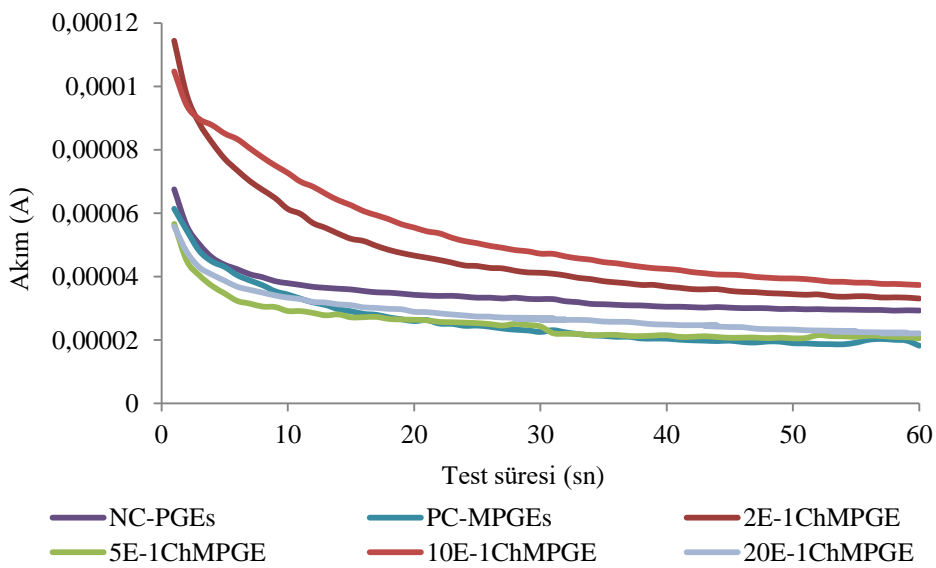
Elektrotların elektrokimyasal analizleri Şekil 6.1'de gösterilen düzenek kullanılarak yapılmıştır. Bu düzenekte 1 numaralı kısım çözelti ile potansiyostat arasında bağlantıların yapıldığı kısımdır. Cihazdan sağlanacak gerilimin elektrotlara iletimi, elektrotlardan elde edilen yanıtların da cihaza iletimi buradaki bağlantılar sayesinde olmaktadır. Ayrıca bağlantıların düzgün olması ve her analiz için yeniden düzenleme yapılmaması adına sabitleyici düzenek kullanılmıştır. 2 numaralı kısım elektrotların yerleştirildiği, içerisinde PBS çözeltisinin ve redoks tepkimelerinin gerçekleşmesini sağlayan $K_3[Fe(CN)_6]$ 'nın bulunduğu, yani analizlerin yapıldığı çözeltiyi ifade etmektedir. OCP, CV ve EIS ölçümlerinin yapıldığı kısım 3 numaralı kısımdır. 4 numaralı kısım sayesinde, ölçüm sonuçları cihaza ait yazılım kullanılarak bilgisayara aktarılmaktadır.



Şekil 6.1: Deney düzeneği.

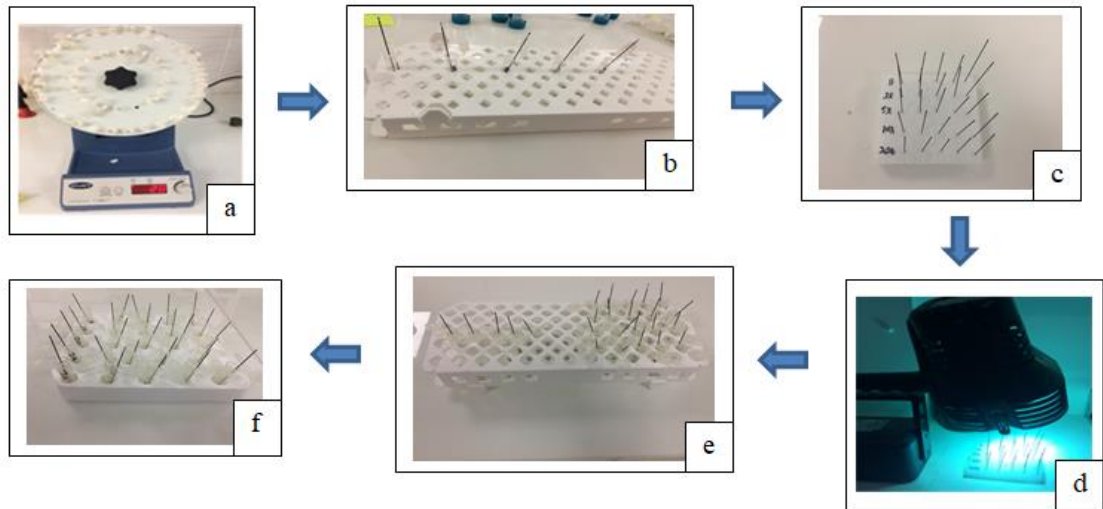
6.3.2 Elektrotların hazırlanması

Kullanılacak elektrotlar, herhangi bir işleme maruz kalmadan, öncelikle ABS çözeltisi içinde 60 sn boyunca optimize edilmiştir. Şekil 6.2’de altı gruba ait ortalama akım-zaman eğrisi yer almaktadır. Bu eğriler 60 sn boyunca +1.4 V gerilim uygulanarak elde edilmiştir. Elektrotlardan ölçülen akım zamanla azalarak denge durumuna ulaşmıştır.



Şekil 6.2: 60 sn boyunca +1.4 V sabit gerilimde ABS içinde anodize edilmiş PGE’ler için ortalama akım-zaman eğrileri.

Daha sonra elektrotların PBS içerisinde OCP, CV ve EIS ölçümleri yapılmış ve böylelikle moleküler baskılama yapılmadan önce elektrotların davranışı belirlenmiştir. Daha sonra elektrotlar altı gruba ayrılmıştır; negatif kontrol grubu (NC-PGEs) (herhangi bir baskılama yapılmayan grup), pozitif kontrol grubu (PC-PGEs), yüzeyine MAGA polimerinin baskılandığı gruptur. Kalan dört grup sırasıyla, 2E-1 M (2E-1ChMPGE), 5E-1 M (5E-1ChMPGE), 10E-1 M (10E-1ChMPGE) ve 20E-1 M (20E-1ChMPGE) kolinin elektrotlara baskılanmasıyla oluşturulmuştur. Kolinin yüzeye bağlanması, fonksiyonel monomer (MAGA) ve çapraz bağlama maddesi (EGDMA) yoluyla kovalent bağ olmadan gerçekleşmektedir. EGDMA, MAGA ve 2 mg AIBN ve değişen molariteye göre hesaplanan kolin miktarları ependorf tüpünde birleştirilmiştir (Şekil 6.3a). Elektrotlar bu tüplere daldırılarak ikişer dakika bekletildikten sonra (Şekil 6.3b) köpüğün üzerine yerleştirilerek 20 dakika UV ışığın altında polimerleşmesi için bırakılmıştır (Şekil 6.3c,d). UV, başlatıcı olarak görev yapan AIBN maddesini aktive etmek için kullanılmaktadır. Polimerleşme süreci tamamlanan tüm elektrotlarda koline özgü boşlukları oluşturmak için, baskılanmış polimer yapıdan kolinin uzaklaştırılması elektrotların 0.1 M HCl çözeltisinde on dakika bekletilmesiyle sağlanmıştır (Şekil 6.3e). Son aşama olarak da elektrotlar ikişer kez beşer dakikalık sürelerle içinde su bulunan ependorf tüplerinde bekletilerek yıkanmıştır (Şekil 6.3f). Böylelikle, kolin molekülünün baskılandığı elektrotlar hazırlanmış ve bütün optimize edilmiş elektrotların CV ve EIS ölçümleri, 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içeren RdxPBS çözeltisinde yapılmıştır.



Şekil 6.3: Moleküler baskılama süreci.

6.4 Kaplamanın AFM Kullanılarak Karakterizasyonu

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), nano boyutta görüntüleme yapan, çok yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edilmesini sağlayan ve bir cismin yüzeyi hakkında bilgi veren mikroskop çeşididir. AFM ile seramiklerin, kompozitlerin, camların, metallerin, polimerlerin ve yarı iletkenlerin yüzeylerindeki aşınma, sürtünme, kaplama, pürüzlülük ve korozyon gibi özellikleri incelenebilmektedir.

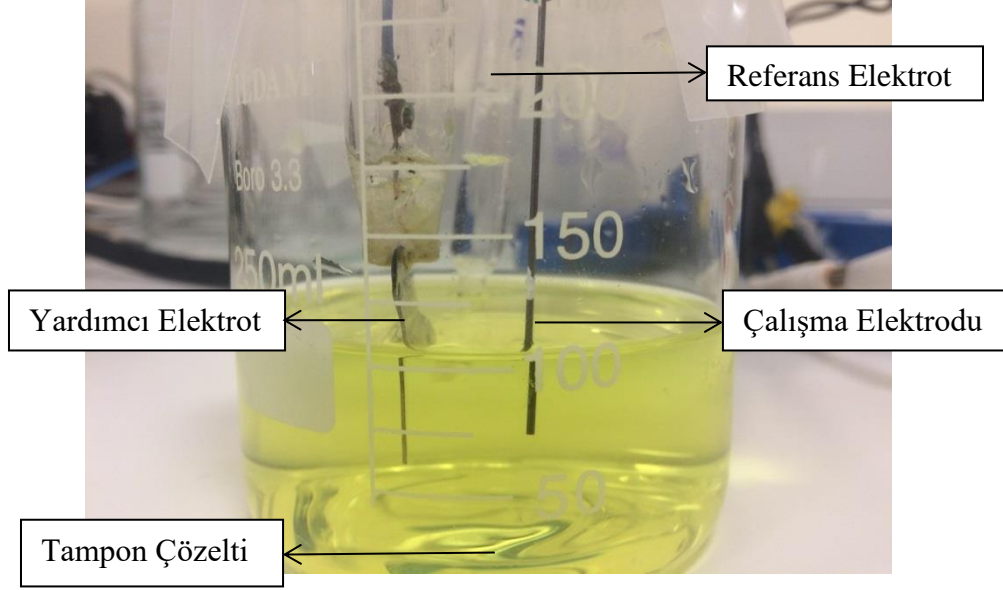
AFM görüntüsü elde edilirken lazer ışını kullanılır. Yüzeğe gönderilen lazer ışını yüzeyin morfolojisine bağlı olarak farklı açılarla yansır ve yansıyan lazer ışınında sapmalar meydana gelir. Bu sapmalar yardımıyla yüzey girinti ve çıkıntıları tespit edilerek yüzeyin topografik görüntüsü elde edilir. Bu çalışmada $9.09 \times 9.09 \mu\text{m}^2$ yüzey alanının taranması sonucu elde edilen görüntüler kullanılarak, elektrot yüzeyindeki kaplamanın kalınlığına ve yüzeyin pürüzlülüğüne bakılmıştır.

AFM görüntüleri elde edildikten sonra, görüntü içinde iki farklı noktadan yükseklik ve derinlik bilgileri alınmıştır. Bu veriler farklı parametreler içermektedir. Bu parametreler; R_a , aritmetik ortalama sapmasını; R_z , beş tane en yüksek ve beş tane en derin noktanın ortalamasını; R_q , aritmetik ortalama sapmalarının karekökünü; R_{pv} , tüm ölçüm uzunluğu için maksimum yükseklik ile maksimum derinliğin toplamını ifade etmektedir [93].

6.5 Kullanılan Yöntem

İlk olarak elektrotlar negatif kontrol grubu (NC-PGEs), pozitif kontrol grubu (PC-PGEs) ve değişen molaritelerde kolın baskılanan dört grup olmak üzere toplamda altı gruba ayrılmıştır.

Bütün elektrotlar ilk olarak ABS tampon çözeltisi içerisinde ön hazırlıktan geçmektedir. Daha sonra elektrot modifikasyonunun basamaklarını karakterize etmek için -500 ve $+500$ mV arasında potansiyel uygulanarak (değişme adımı: 20 mV, tarama hızı: 50 mV/s) dönüşümlü voltametri ölçümleri yapılmıştır. Dönüşümlü voltametri grafikleri, Şekil 6.4'te görüldüğü gibi, içerisinde 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ bulunan RdxPBS redoks çözeltisi içerisinde elde edilmiştir. Empedans ölçümleri için de Şekil 6.4'teki düzenek ve çözelti kullanılarak, 100 kHz ile 0.1 Hz arasındaki frekans aralığında ölçümler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 6.4: Grafit elektrotların PBS çözeltisi içinde görünümü.

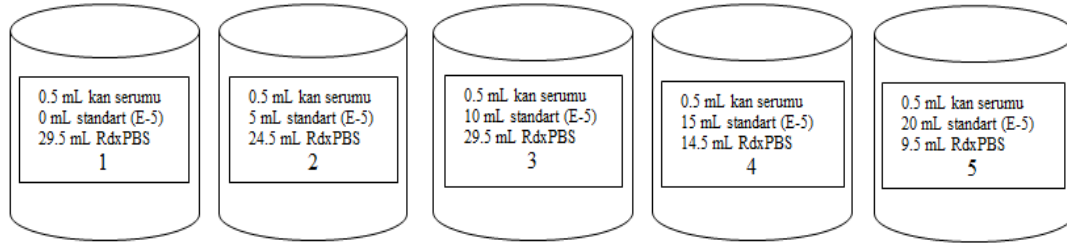
Negatif kontrol grubu dışında kalan tüm elektrotlara uygulanan işlem moleküler baskılama işlemidir. Pozitif kontrol grubu elektrotları şablon molekül olan kolini içermeyen çözeltinin içerisine, diğer elektrotlar da farklı molaritelerde kolin içeren çözeltilere batırılarak hazırlanmıştır. Pozitif elektrotların yüzeyi sadece MAGA polimeriyle kaplanırken, diğer grup elektrotları farklı miktarlarda kolin içeren (2E-1 M, 5E-1 M, 10E-1 M, 20E-1 M) polimerle kaplanmıştır.

Elektrotlar beş farklı mol sayısında kolin içeren çözeltilerde analiz edilmiştir. Çözeltiler, 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içeren RdxPBS çözeltisine sırasıyla E-11, E-10, E-9, E-8, E-7 ve E-6 M kolin içeren çözeltilerin ilave edilmesiyle elde edilmiştir. RdxPBS çözeltisinde bulunan optimize edilmiş elektrotların OCP, CV ve EIS analizleri yapılmıştır. Elektrotların her bir çözeltiliye verdiği yanıtlar incelenmiş ve kolin tespiti yapılabilen aralıklar belirlenmiştir.

Elektrotların koline karşı seçici olduğunu göstermek amacıyla değişen derişimlerde TRIS molekülü içeren RdxPBS çözeltisinde EIS analizleri yapılmıştır. TRIS çözeltileri, derişimleri daha önce hazırlanan kolin çözeltileriyle eşit derişimde TRIS (E-11, E-10, E-9, E-8, E-7 ve E-6 M) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Elektrotların her bir TRIS çözeltisine verdiği yanıtlar incelenmiş ve MIP bazlı PGE'lerin koline karşı seçicilik gösterdiği saptanmıştır.

Bir sonraki adım olan elektrotların kan serumundaki analizi için kalibrasyon metotlarından standart katma metodu kullanılmıştır. Bu metotla kandaki kolin miktarının saptanması hedeflenmiştir. Standart katma metodunda kullanılan örnek

kompleks bir karışım ya da içeriği bilinmeyen bir madde olduğu için analit dışında başka maddeler de bulunmakta ve elde edilen sinyali etkilemektedir. Bu tür durumlarda ve potansiyometrik/voltametik ölçümlerin yapıldığı analizlerde bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır. Çok sayıda ölçmeyle yapılan hesaplama yöntemine göre örneğe eklenen standart analite yakın miktarda bileşen içerecek şekilde seçilmelidir [94]. Kan serumunun seyreltilmesiyle sahip olduğu kolin miktarına en yakın derişimde kolin içeren çözelti, E-5 çözeltisi, standart olarak seçilmiştir. Şekil 6.5'te belirtildiği gibi, bu yöntemde, beş ölçüm kabına 0.5 mL kan serumu eklenmiştir. Sırasıyla her kaba 5, 10, 15 ve 20 mL standart ilave edilmiş ve her ölçüm kabına 30 mL'ye tamamlanacak şekilde RdxPBS çözeltisi eklenmiştir.



Şekil 6.5: Standart katma metodu.

Çözeltilerin, ilave edilen standardın hacimlerine karşı OCP, CV ve EIS yanıtları elde edilmiştir. EIS grafiğinden elde edilen verilere göre çizilen doğru grafiğinde eğim (m) ve y eksenini kestiği noktalar (b) saptanarak bu değerler çözeltideki analit miktarını belirlemede kullanılmıştır [94].

$$A = \frac{k * V_S * C_S}{V_T} + \frac{k * V_X * C_X}{V_T} \quad 6.1$$

A: Enstrüman yanıtı

V_S : Standardın hacmi (değişken, 0, 5, 10, 15, 20 mL)

C_S : Standardın derişimi

V_X : Analitin hacmi

C_X : Analitin derişimi

V_T : Toplam hacim

k: orantı sabiti

$$k = \frac{A_i}{A_1} \quad 6.2$$

A_i : i numaralı çözeltiden elde edilen yanıt

A_1 : 1 numaralı çözeltiden (0 mL standart içeren) elde edilen yanıt

Bu yöntemde analitin derişimi C_X iki yolla belirlenebilir [94];

1. Eklenen hacme karşı empedans yanıtlarını içeren grafik çizilir. Bu grafikten elde edilen doğrunun eğimi m ve y eksenini kestiği nokta b ile gösterilirse,

$$A = m * V_S + b \quad 6.3$$

$$m = \frac{k * C_S}{V_T} \quad 6.4$$

$$b = \frac{k * V_X * C_X}{V_T} \quad 6.5$$

$$\frac{b}{m} = \frac{k * V_X * C_X}{V_T} * \frac{V_T}{k * C_S} \quad 6.6$$

$$C_X = \frac{b * C_S}{m * V_X} \quad 6.7$$

şeklinde elde edilebilir.

2. Ölçüm sonuçlarına göre elde edilen doğrunun extrapole edilmesiyle x eksenini kestiği nokta ($V_s=0$ noktası) enstrüman yanıtı olarak belirlenir ve bilinmeyen analit miktarına eşit miktarda analit içeren standart çözeltinin hacmini tanımlar.

$A=0$ olduğunda,

$$A = \frac{k * (V_S * C_S)}{V_T} + \frac{k * (V_X * C_X)}{V_T} = 0 \quad 6.8$$

$$C_X = -\frac{(V_S)_0 * C_S}{V_X} \quad 6.9$$

şeklinde hesaplanabilir.

Analizi yapılan her elektrot işlem sonunda önce on dk 0.1 M HCl içerisinde sonra beşer dakika iki farklı ependorf tüpünde deiyonize su ile yıkanmıştır. İkinci yıkamada ise beşer dakikalık sürelerle önce 0.1 M HCl içinde sonra iki farklı ependorf tüpünde deiyonize su ile yıkanarak tekrar kullanıma hazır hale getirilmiştir.



7. SONUÇ

Bu çalışmada kolin molekülüne duyarlı impedimetrik biyosensör geliştirilmesi amaçlanarak, PGE'ler üzerinde koline duyarlı tanıma bölgeleri MIP yöntemiyle oluşturulmuştur. Moleküler baskılı elektrotlar, sentetik kolin reseptörleri olarak kullanılmış ve bu yöntemle oluşturulan biyosensörlerin PBS çözeltisindeki değişime verdiği yanıtlar elektrokimyasal yöntemle incelenmiştir.

İlk aşama olan, elektrotların ABS çözeltisi içinde optimize edilmesinin sonucunda tüm elektrotların akım değerlerinin, 24.3 μ A ile 0.974 μ A aralığında azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Elektrotlar, farklı molaritelerde kolin içeren polimerlerle baskılandıktan sonra, farklı molaritelerde kolin içeren çözeltilerde CV ve EIS ölçümleri yapılarak akım, gerilim, empedansta meydana gelen değişimler ele alınmıştır. Bu çalışmada, elektron transfer maddesi olarak, redoks tepkimelerinin gerçekleşmesini sağlayan $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ potasyum ferrisiyanid ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) (Rdx) kullanılmıştır.

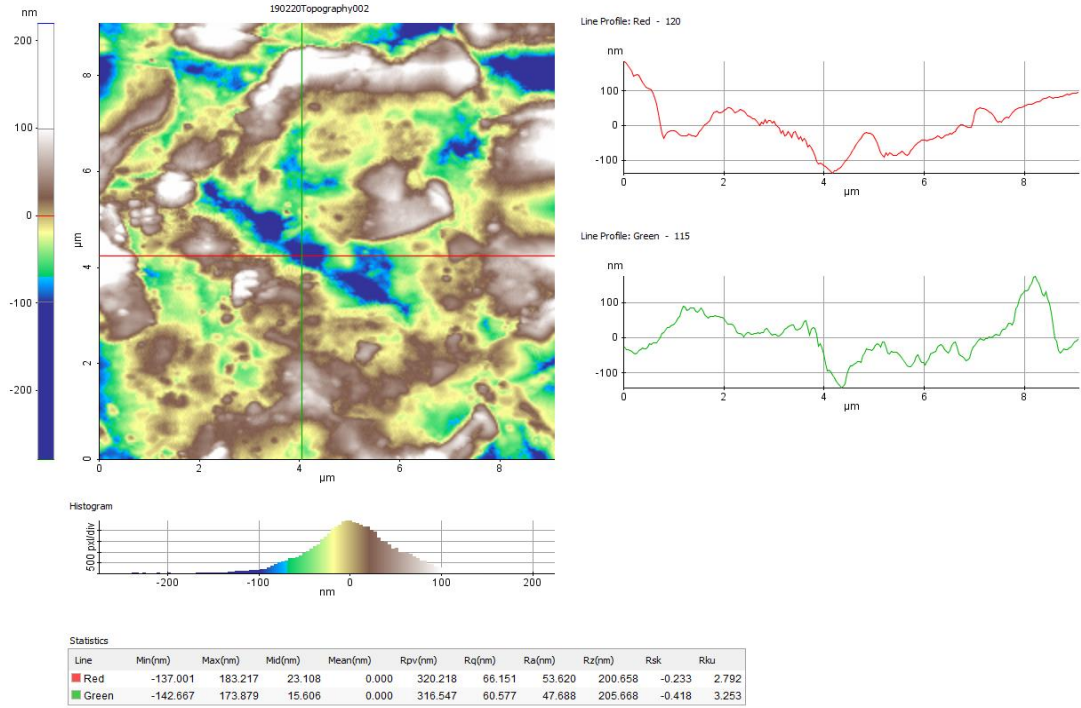
Elektrot üzerindeki polimer yapıda oluşturulan kolin boşlukları şablon molekülü ile geometrik ve fonksiyonel olarak eşleşme göstermektedir. Grafit elektrotlar üzerine farklı molaritelerde kolin baskılama yapılması, farklı sayıda şablonun oluşmasına neden olmaktadır. Koline özgü şablonların sayısının fazla olması daha çok kolin molekülünün bağlanmasına olanak sağlar. Bağlanmanın elektrotlar üzerindeki polimer yapılarda meydana getirdiği akım, gerilim ve empedans değişimleri CV ve EIS yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Çözeltide bulunan kolin molekülünün derişimiyle ölçülen akımın orantılı şekilde değişiklik gösterdiği görülmüştür. Analizi yapılan kolin molekülünün derişimindeki değişim R_{ct} değerinin de değişmesine neden olmaktadır. Negatif kontrol grubundaki R_{ct} değerinin en yüksek olduğu ve elektrotların kaplanmasıyla R_{ct} değerinde bir düşüş görüldüğü ve yapılan deney sonuçlarında kolin molekülünün elektrot yüzeyine tutunması arttıkça, yük transfer direncinin (R_{ct}) arttığı görülmektedir. Kolin molekülünün derişimindeki artışla birlikte biyosensörün yüzeyinde artan miktarda molekül tutunacağından, empedansın da beklendiği şekilde arttığı görülmektedir. Analizi yapılan çözeltinin derişimi

arttıkça, kolinin elektrot yüzeyine tutunumu artar ve $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$ den kaynaklı yük transferinin engellenmesine neden olur. Sonuç olarak CV grafiklerinde görülen, indirgenme-yükseltgenmeyi ifade eden, daha düşük genlikte dönüşümlü voltamogram pikleri elde edilmektedir.

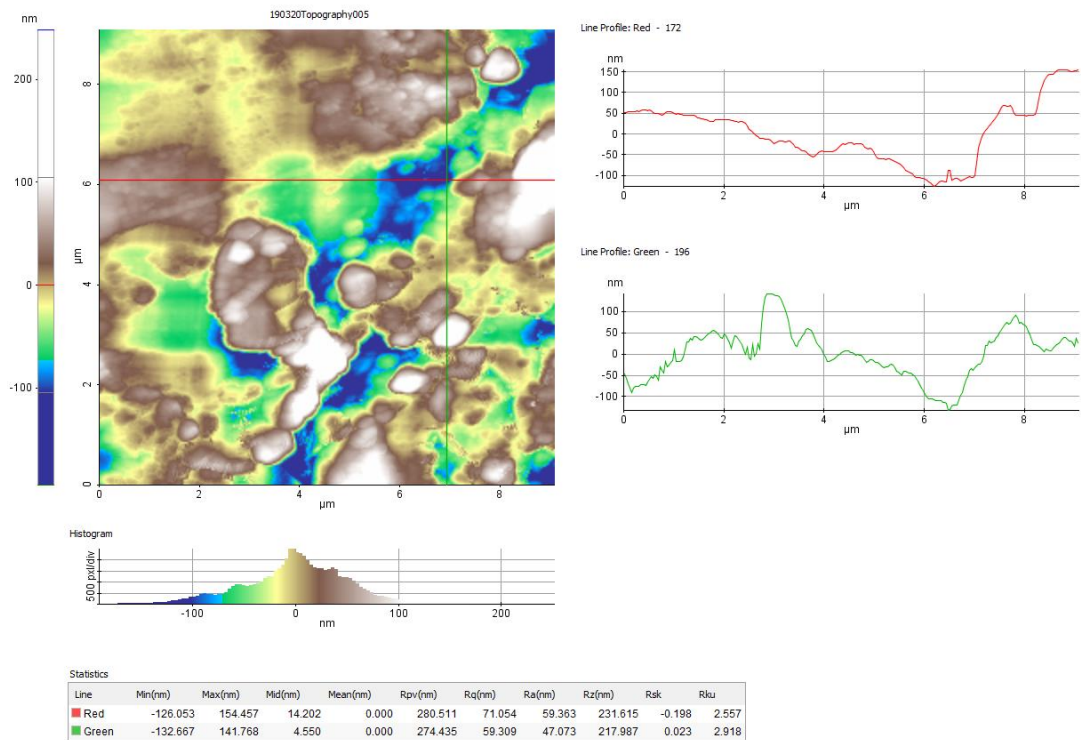
7.1 Kalem Grafit Elektrotların Yüzey Karakterizasyonu

Grafit elektrotların yüzeyinde polimer kaplamanın gerçekleştiğini göstermek ve kaplama kalınlığıyla ilgili veri elde etmek amacıyla AFM görüntüleri alınmıştır.

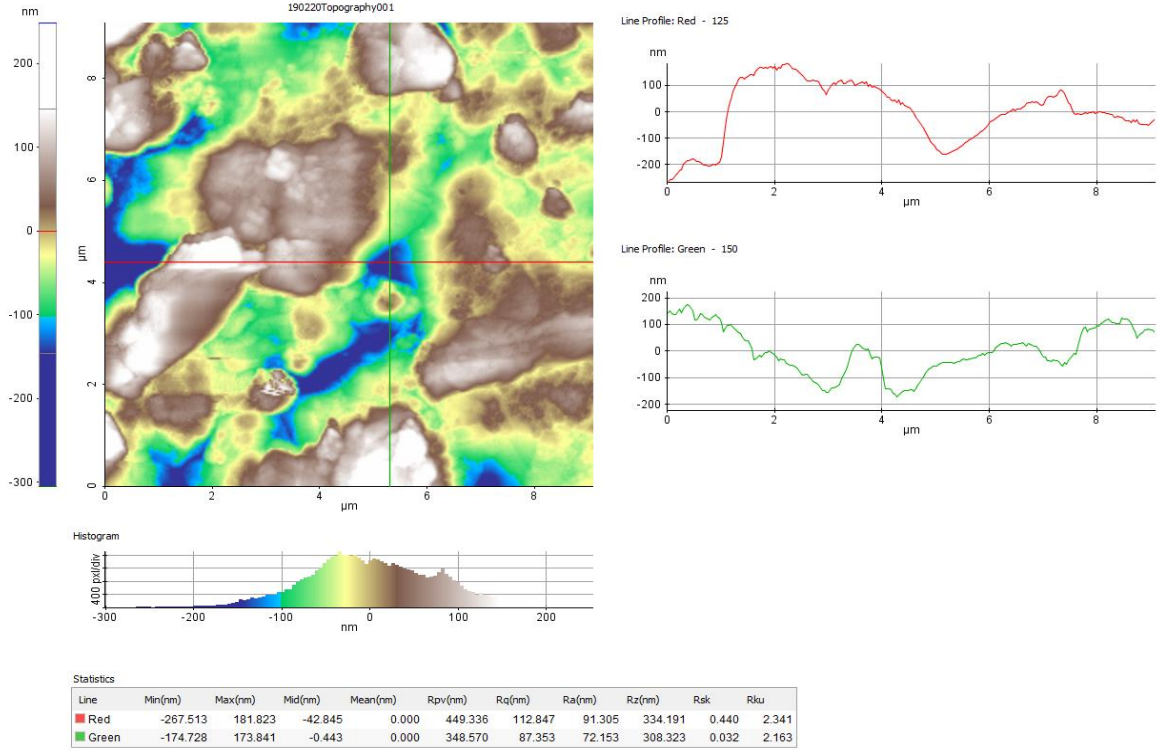
Şekil 7.1 kolin baskılaması yapılmayan yalın PGE'nin, Şekil 7.2, Şekil 7.3 ve Şekil 7.4 sırasıyla 2E-1ChMPGE, 5E-1ChMPGE, 10E-1ChMPGE ve 20E-1ChMPGE elektrotlarına kolinin tutunmuş halde bulunduğu yüzey görüntülerini ifade etmektedir. Baskılama yapılan elektrotlardan elde edilen görüntülerle yalın haldeki elektrot görüntüsü karşılaştırıldığında, baskılama yapılan elektrotların topografik yükseklik verilerinin kaplama yapılmayan elektrottan fazla olduğu tespit edilerek elektrot yüzeylerinde kaplamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Baskılama yapılmayan elektrodun ortalama kaplama kalınlığı 200.658 nm olurken, 2E-1ChMPGE elektrodunun 231.615 nm, 5E-1ChMPGE elektrodunun 334.191 nm, 10E-1ChMPGE elektrodunun 277.674 nm ve 20E-1ChMPGE elektrodunun ise 304.922 nm olarak saptanmıştır.



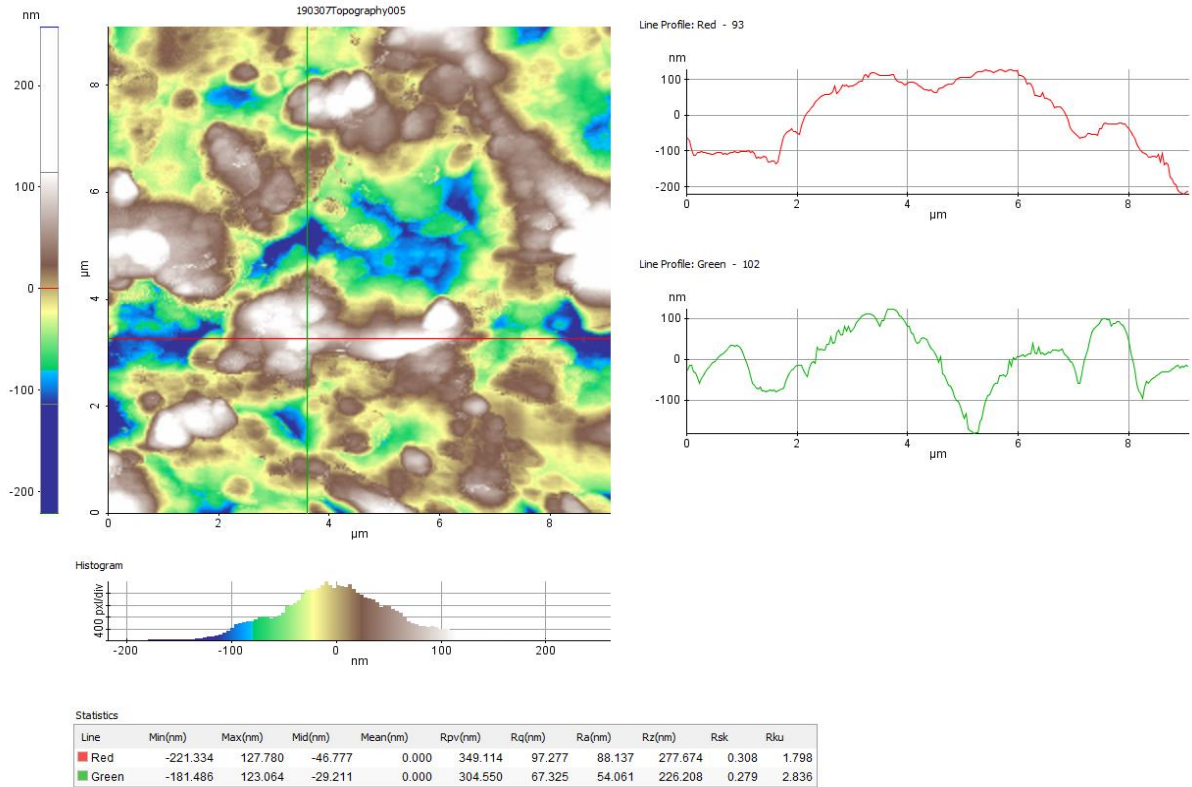
Şekil 7.1: Kaplama yapılmayan elektrodun AFM görüntüsü.



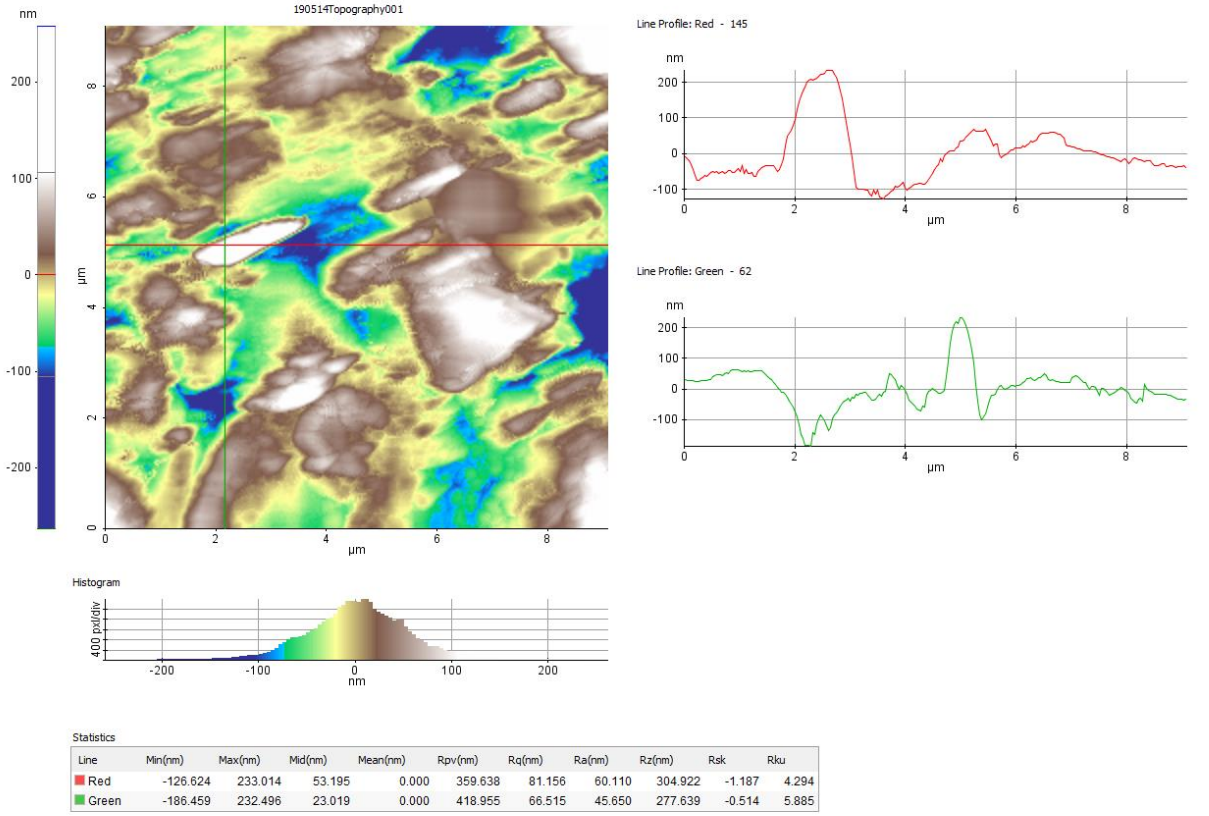
Şekil 7.2: 2E-1ChMPGE elektrodun AFM görüntüsü.



Şekil 7.3: 5E-1ChMPGE elektrodunun AFM görüntüsü.



Şekil 7.4: 10E-1ChMPGE elektrodunun AFM görüntüsü.



Şekil 7.5: 20E-1ChMPGE elektrodunun AFM görüntüsü.

7.2 Elektrotların RdxPBS İçinde Analizi

7.2.1 Kontrol grubu

7.2.1.1 Negatif kontrol grubu

Elektrokimyasal ölçümler sonucunda elde edilen CV grafiği, elektron transfer kinetiği ve elektron transferinin sonuçları hakkında bilgi verirken; EIS grafiği, elektrot arayüzünün tepkime karakteristiği hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca, CV grafiği indirgenme-yükseltgenme tepkimeleri sonucu meydana gelen elektron transfer kinetiğindeki değişimi belirtmektedir [95].

Moleküler baskılama uygulanmayan negatif kontrol grubu elektrotlarının CV ve EIS ölçümleri çözeltinin davranışını ifade etmektedir. Bu yüzden negatif kontrol grubu, referans grup olarak düşünülebilir.

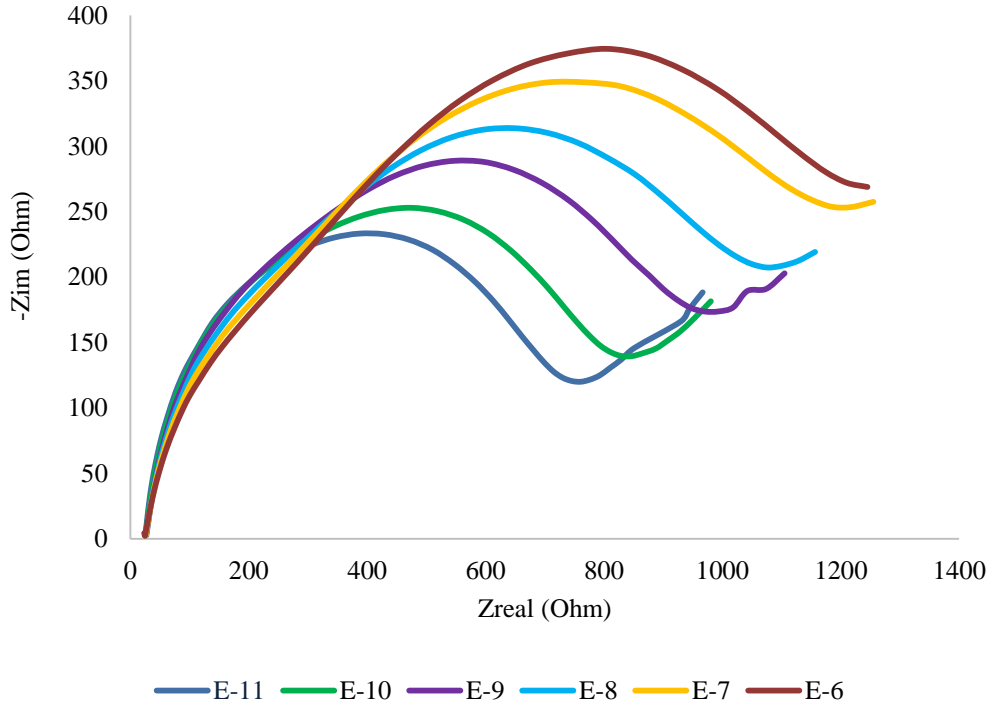
Nyquist diyagramından elde edilen yarım dairenin çapının, çözültide bulunan kolin derişiminin artmasıyla korrele olacak şekilde artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu da aynı zamanda R_{ct} nin artmış olduğunu ifade etmektedir. Negatif kontrol grubunda

kolinin bağlanabileceği herhangi bir bağlanma boşluğu bulunmamasına rağmen R_{ct} 'de artış meydana gelmesi, derişimin artmasıyla elektrot yüzeyinin spesifik olmayan bir kaplanma ile kaplandığını göstermektedir.

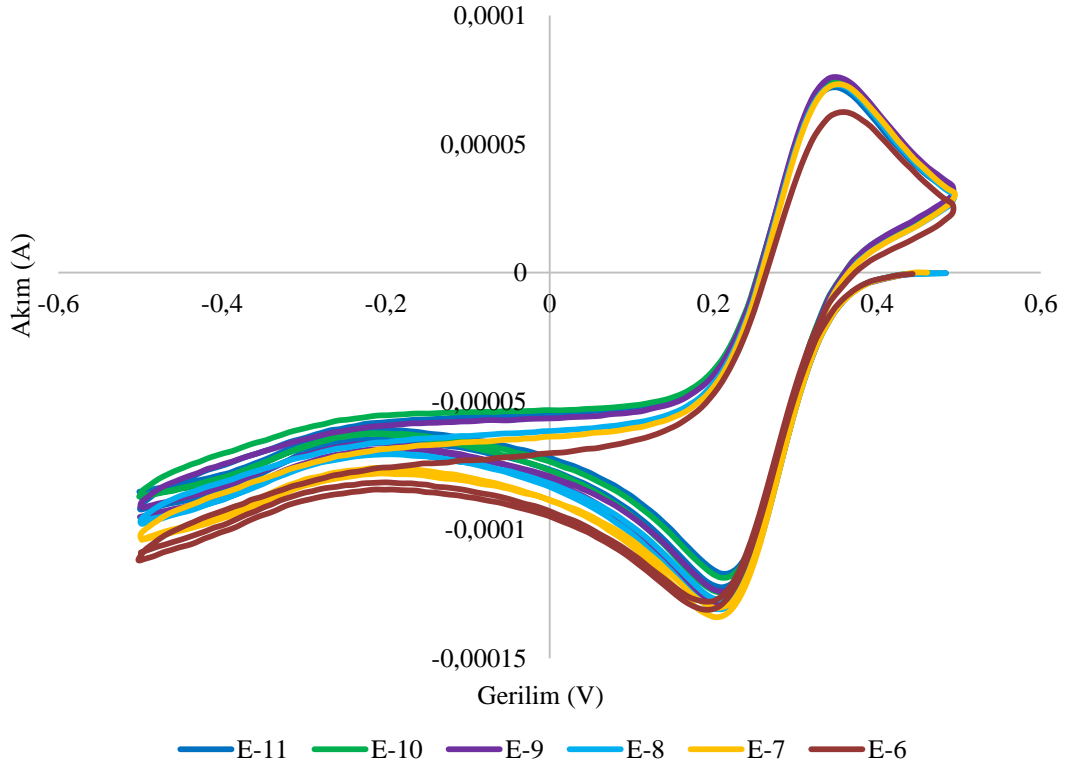
Negatif kontrol grubunun elektrokimyasal empedans (EIS) özellikleri Şekil 7.6'da gösterildiği gibi değeri E-11 M ile E-6 M arasında değişen kolin çözeltilerinde incelenmiştir. Polimer kaplama olmayan negatif kontrol grubu kalem grafit elektrotlarının Şekil 7.6 ve Şekil 7.7'de gösterilen EIS ve CV davranışı, polimerle kaplanmamış anodize edilmiş elektrotların çözelti iyonları ile etkileşimini ifade etmektedir. Baskılama olmayan elektrotlarda R_{ct} değerinin yani yarım daire çapının düşük miktarlarda değiştiği Çizelge 7.1'de gösterilmektedir. Artan kolin konsantrasyonu ile R_{ct} değerinin artması kolinin yüzeye olan afinitesinden dolayı spesifik olmayan bağlanma şeklinde açıklanabilir.

Çizelge 7.1: Negatif kontrol grubu elektrodunun EIS verileri.

Kolin Derişimi (M)	$\Delta Z(\text{real}) (\Omega)$	$R_{ct} (\Omega)$
E-11	313,7175	233,3352
E-10	399,3524	253,0453
E-9	523,1483	288,9397
E-8	628,2213	313,8296
E-7	770,8189	348,9922
E-6	797,9512	374,5256



Şekil 7.6: Negatif kontrol grubu elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.



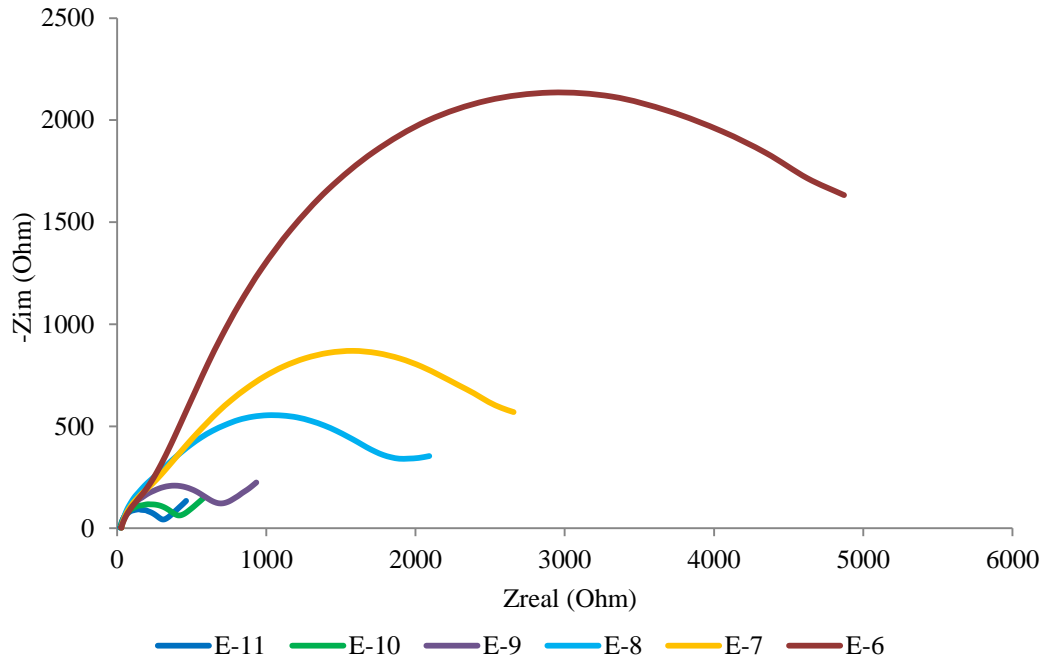
Şekil 7.7: Negatif kontrol grubu elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.

7.2.1.2 Pozitif kontrol grubu

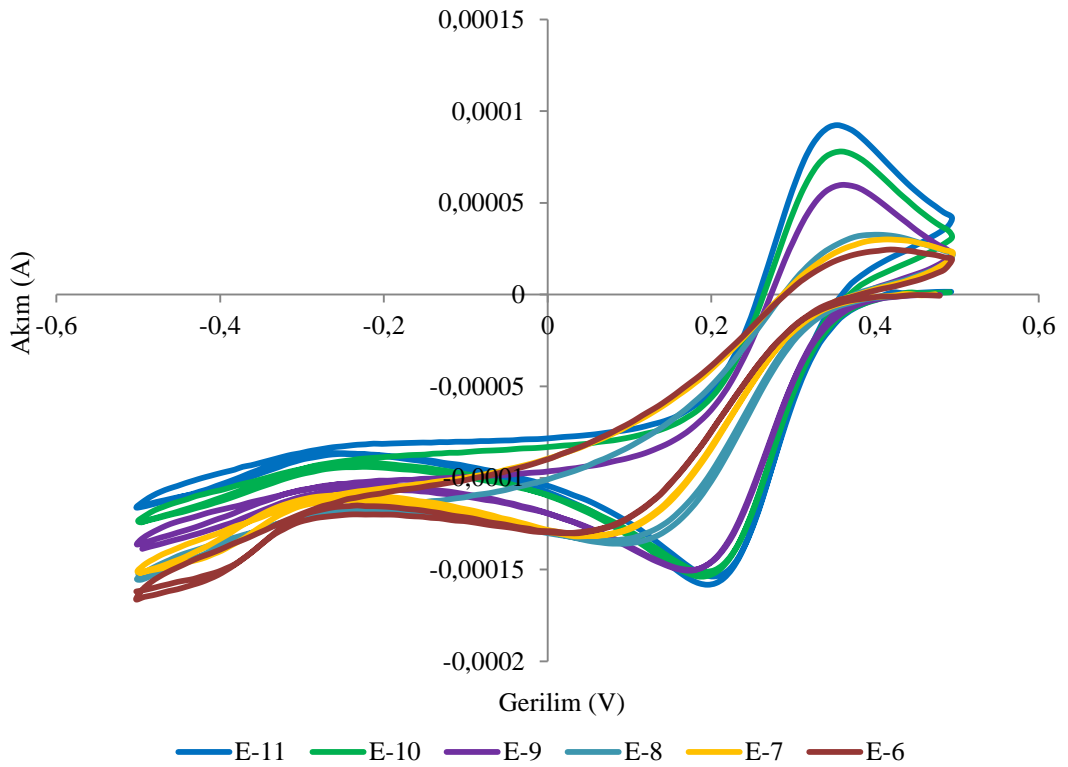
Pozitif kontrol grubu elektrotları kolin içermeyecek şekilde polimerle kaplanmıştır. Polimerle kaplamanın, CV ve EIS grafiklerine bakıldığında pozitif kontrol grubunun hücre potansiyelini, mevcut genliğini ve pik potansiyelini arttırdığı görülmektedir. Bunun yanı sıra, PGE'ler 7.16×10^{-11} (E-11) ile 7.16×10^{-6} M (E-6) çözeltileri kullanılarak tanımlandığından, kolin PGE'lerin hücre potansiyeli ve pik potansiyeli artmaya devam etmiştir. PGE'lerin empedansı, polimerin iletken özelliği nedeniyle azalarak, artan kolin çözelti derişimiyle birlikte artış göstermektedir. Şekil 7.8'de, kolin molekülünün afinitesine bağlı olarak polimere spesifik olmayan bağlanması sonucunda empedansta artış meydana geldiği görülmektedir. Şekil 7.9'da ifade edilen pozitif kontrol grubu elektrodunun CV grafiği ele alındığında, katot akımının artan kolin konsantrasyonuyla düştüğü görülmektedir. İndirgenme-yükseltgenme tepkimeleriyle meydana gelen elektron transfer kinetiğinin değişmesiyle de anot ve katot akımlarının değişen kolin çözeltileri içinde farklılaştığı görülmektedir. Bunun yanı sıra çözeltinin kolin konsantrasyonunun artmasıyla empedansta ve R_{ct} değerinde meydana gelen değişimler Çizelge 7.2'de belirtilmektedir.

Çizelge 7.2: Pozitif kontrol grubu elektrodunun EIS verileri.

Kolin Derişimi (M)	$\Delta Z(\text{real}) (\Omega)$	$R_{ct} (\Omega)$
E-11	26,79013	93,0620
E-10	133,3212	118,0417
E-9	404,1480	209,2329
E-8	1607,9110	554,1570
E-7	2373,0540	869,6959
E-6	4587,1240	2135,1920



Şekil 7.8: Pozitif kontrol grubu elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.



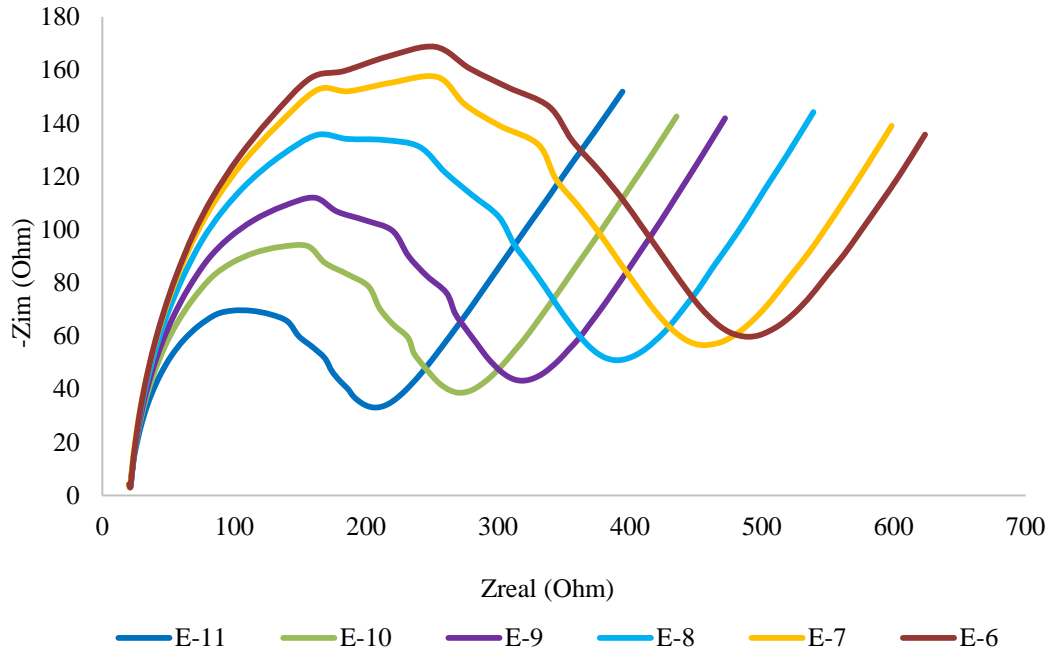
Şekil 7.9: Pozitif kontrol grubu elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.

7.2.2 Deneysel gruplar

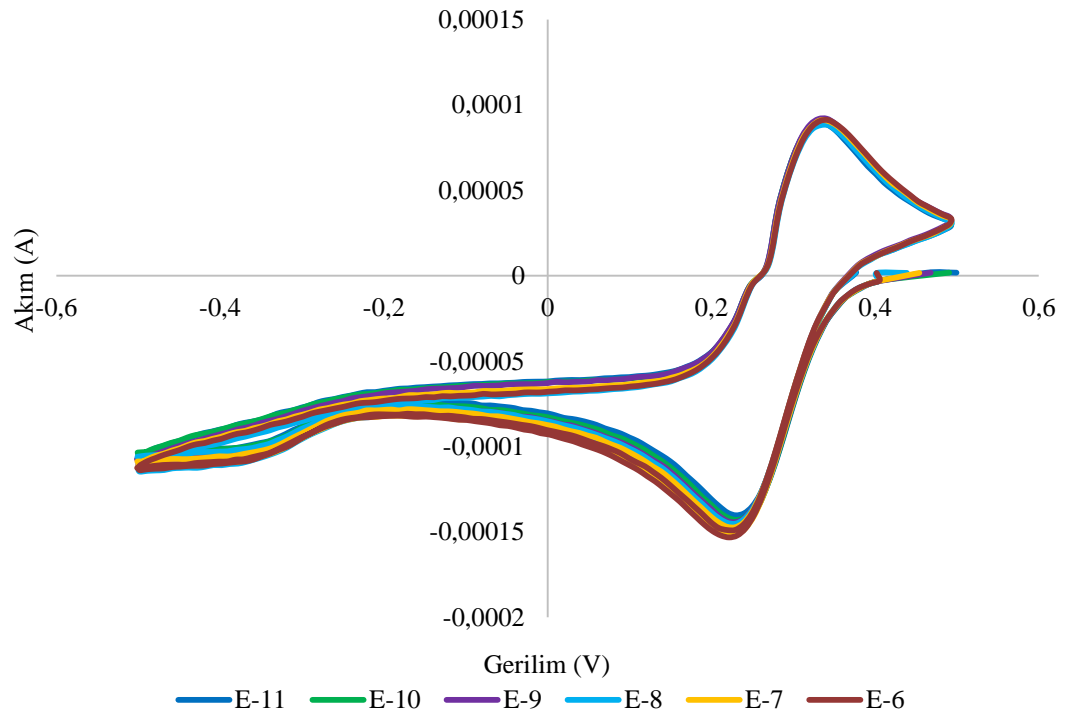
Bu çalışmada, deneysel grubu oluşturan elektrotların verilerinin değerlendirilmesiyle, elektrotlara baskı yapılacak kolin konsantrasyonu için, E-1 M'nin iki katı olan 2E-1 M seçilmiştir [78].

Şekil 7.10, E-11 ile E-6 aralığında farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerde 2E-1ChMPGE elektrodunun davranışını göstermektedir. Şekil 7.13, Şekil 7.16 ve Şekil 7.19'da sırasıyla altı farklı kolin derişimine sahip çözeltide 5E-1ChMPGE, 10E-1ChMPGE ve 20E-1ChMPGE elektrotlarından elde edilen EIS grafikleri gösterilmektedir. Bu üç grafikte, elektrotlar üzerindeki kolin boşluklarının artırılmasıyla bu boşluklara daha fazla kolinin bağlanabileceği ve dolayısıyla PGE'nin empedansının beklendiği gibi artış gösterdiği görülmektedir. Elektrot üzerine baskılanmış kolinin derişimi, kolinin bağlanma özelliğini etkilemektedir. Kolinin çözeltideki derişimi artarken, Nyquist diyagramının yarım dairesinin çapı, R_{ct} de artış gösterir çünkü elektrotlara kolin adsorpsiyonu artmış olur. Şekil 7.10'da, bu elektrodun E-11 ile E-6 aralığındaki çözeltilerde bulunan kolin molaritesini ayırıştırabildiği görülmektedir.

Şekil 7.11, Şekil 7.14, Şekil 7.17 ve Şekil 7.20 sırasıyla 2E-1ChMPGE, 5E-1ChMPGE, 10E-1ChMPGE ve 20E-1ChMPGE elektrotlarının CV grafiklerini ifade etmektedir. Bu grafikler, -500/+500 mV aralığında, değişen gerilime karşı akımda meydana gelen değişimi göstermektedir. Şekil 7.11, Şekil 7.14 ve Şekil 7.17 incelendiğinde, artan kolin derişimiyle anodik akımlar ve hücre potansiyeli sabit kalırken, katodik akımların arttığı görülmektedir. Çözeltideki koline bağlı olarak, iletkenliğin arttığı ve böylelikle de akımın arttığı gözlemlenmektedir.



Şekil 7.10: 2E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.



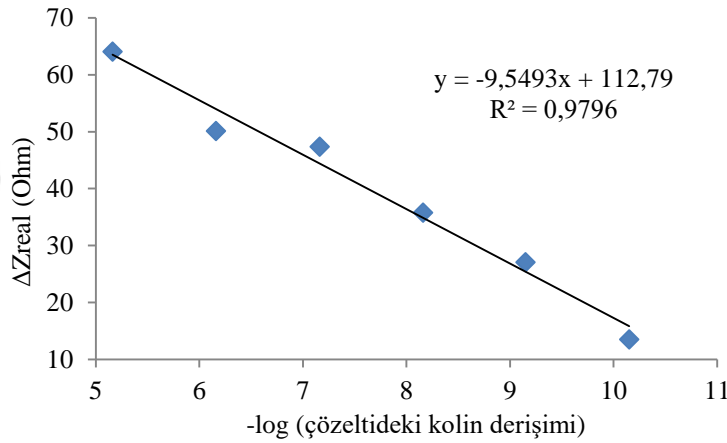
Şekil 7.11: 2E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.

Çizelge 7.3'te, 2E-1ChMPGE elektrodu için, çözelti içerisinde farklı kolin konsantrasyonuna bağlı olarak empedans ve R_{ct} değerlerindeki değişim gösterilmektedir.

Çizelge 7.3: 2E-1ChMPGE elektrodunun EIS verileri.

Kolin Derişimi (M)	$\Delta Z(\text{real}) (\Omega)$	$R_{ct} (\Omega)$
E-11	68,2779	69,5442
E-10	134,3348	93,7972
E-9	179,3169	112,0161
E-8	253,4650	135,6097
E-7	317,1946	152,5439
E-6	351,1137	168,7690

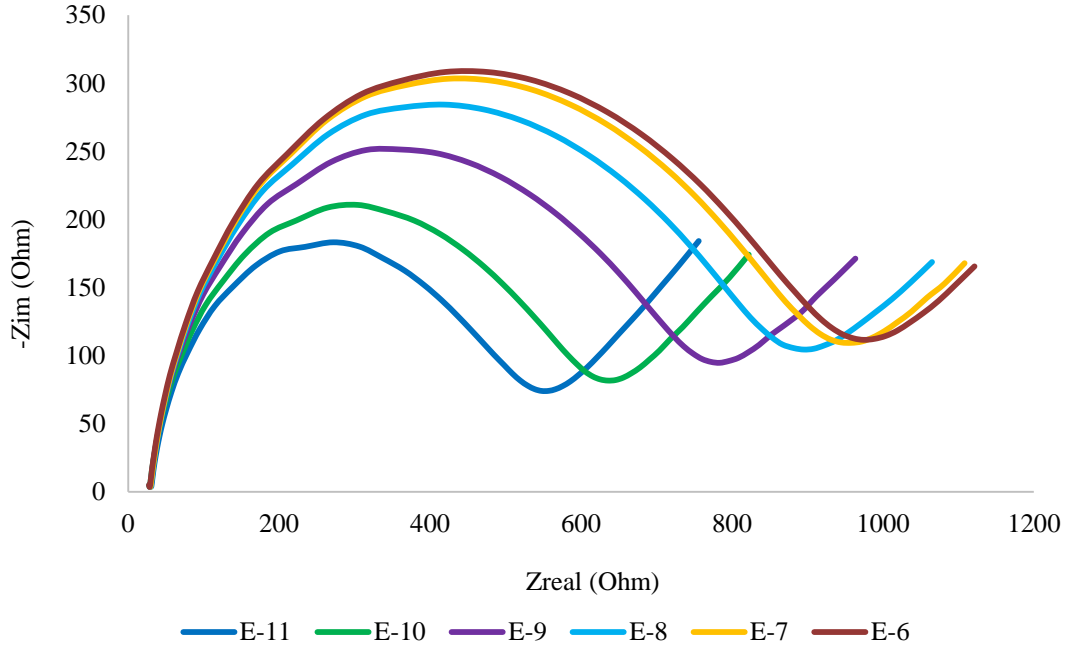
Çizelge 7.3'te verilen empedans değişimi baz alınarak yapılan regresyon analizi sonucunda, 2E-1ChMPGE elektrodunun %97.96 oranında başarıyla kolin tespiti yaptığı söylenebilmektedir (Şekil 7.12).



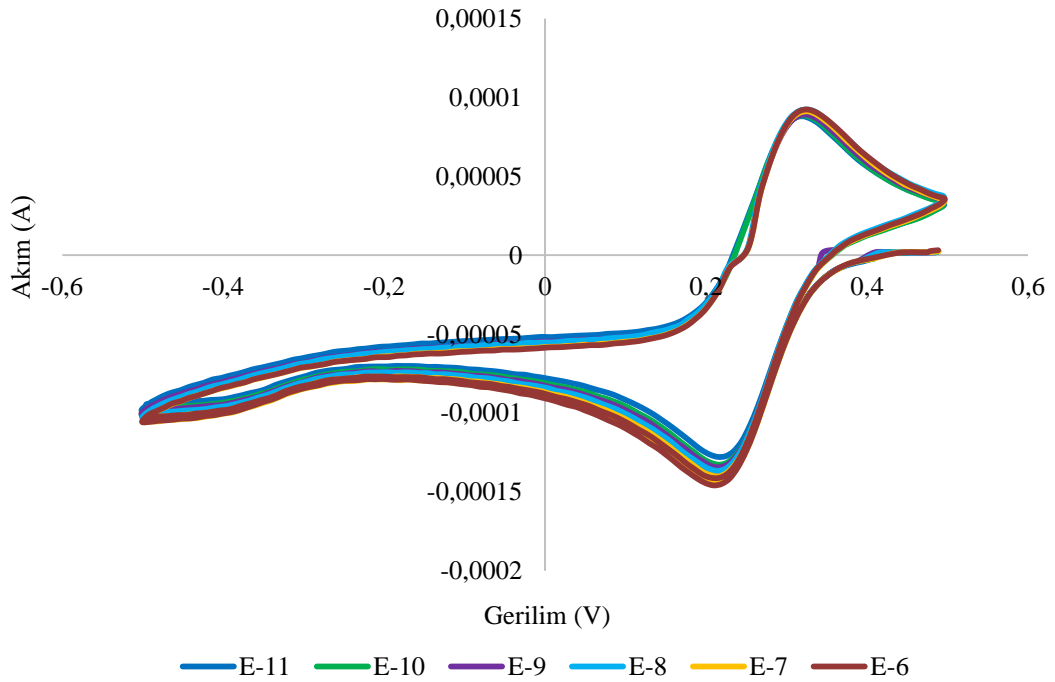
Şekil 7.12: 2E-1ChMPGE elektrodunun kalibrasyon eğrisi.

5E-1ChMPGE elektrodu, Şekil 7.13'te görüldüğü gibi E-11 M ile E-7 M aralığındaki kolin miktarını etkili bir şekilde ayırtmak için kullanılabilir. E-7 ve E-6 çözültülerinin R_{ct} değerleri birbirine oldukça yakındır ve bu çözültüler benzer davranış göstermektedir. Bu durum, 5E-1ChMPGE elektrodunun E-7 M'nin üzerindeki kolin derişimlerini tespit etmek için uygun olmadığını ve bu aralıkta etkili ayırtma yapamayacağını göstermektedir.

Şekil 7.11 ve Şekil 7.14'teki CV grafiklerinde ise kolin konsantrasyonunun çözelti içinde artmasıyla anot akımları değişmezken çözeltilerdeki kolin derişiminin artışına bağılı olarak katot akımlarının arttığı görülmektedir.



Şekil 7.13: 5E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.



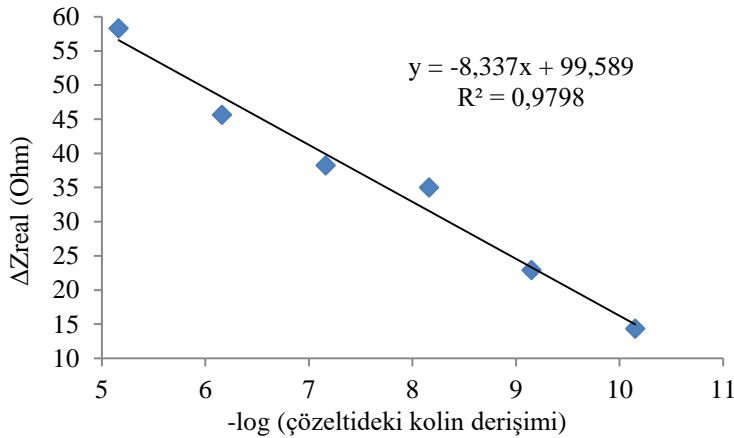
Şekil 7.14: 5E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.

Artan kolin derişimine karşı elektrotta meydana gelen empedans ve R_{ct} değerlerindeki değişimi ifade eden Çizelge 7.4, 5E-1ChMPGE elektrodunun değerlerinde düzenli bir artış olduğunu göstermektedir.

Çizelge 7.4: 5E-1ChMPGE elektrodunun EIS verileri.

Kolin Derişimi (M)	$\Delta Z(\text{real})$ (Ω)	R_{ct} (Ω)
E-11	14,36055	23,49742
E-10	22,91624	25,97744
E-9	35,04153	28,28619
E-8	38,24448	29,74755
E-7	45,67146	32,57984
E-6	58,29659	36,37685

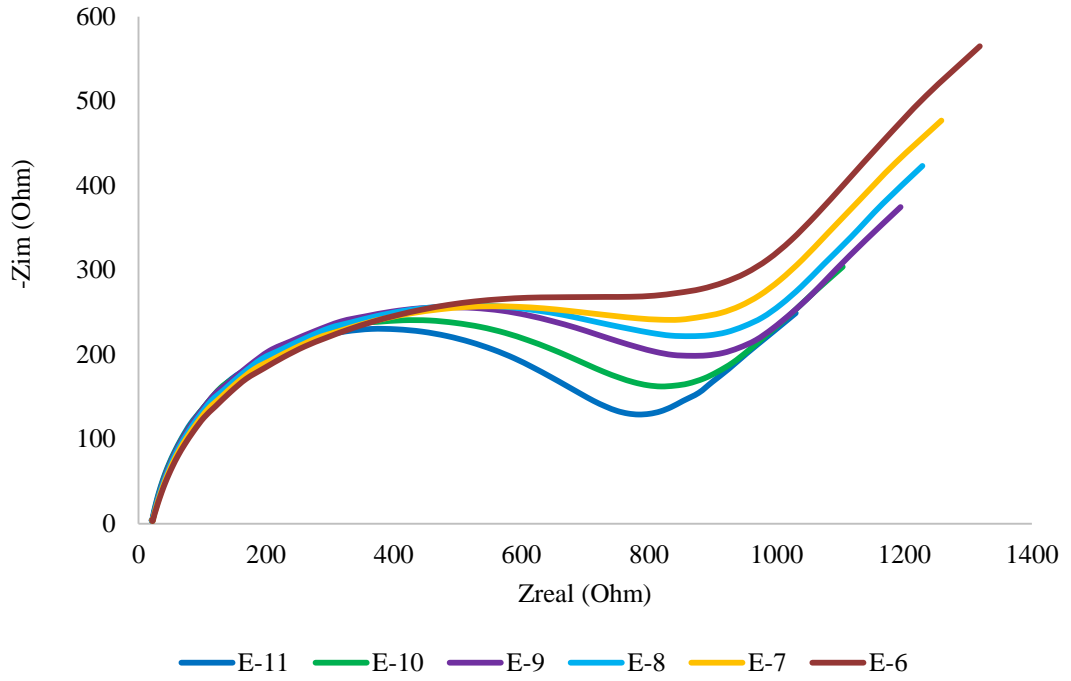
Şekil 7.15'te belirtilen, 5E-1ChMPGE elektroduna ait regresyon eğrisine göre, bu elektrot kullanılarak %97.98 başarıyla kolin tespit edilebildiği görülmektedir.



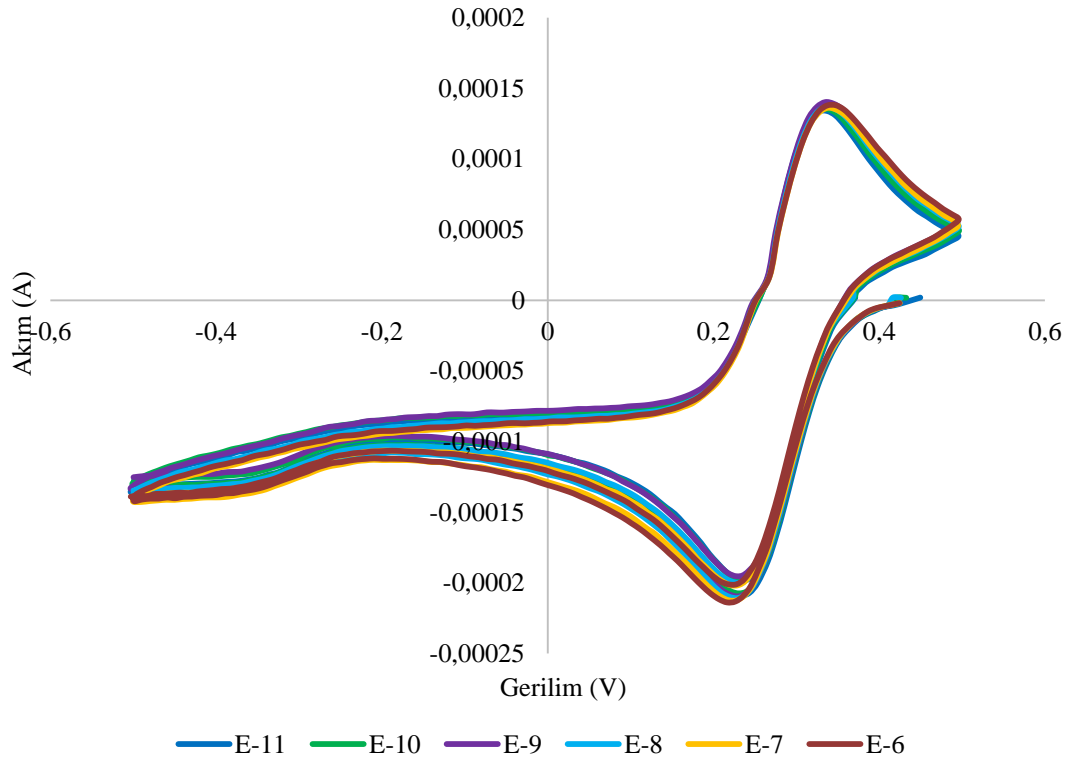
Şekil 7.15: 5E-1ChMPGE elektrodunun kalibrasyon eğrisi.

Şekil 7.16'da görüldüğü üzere 10E-1ChMPGE elektrodu, E-11 M ile E-9 M aralığındaki ayrışmayı yapabilirken E-9 M'den yüksek derişimler için etkili ayrıştırma yapamamaktadır. Şekil 7.16'da görülen yarım daire çaplarının E-9, E-8, E-7 ve E-6 çözeltilerinde oldukça yakın olması ve elektrodun benzer davranış göstermesi bu derişimlerde yeterli ayrışma yapılamayacağını ifade etmektedir.

Şekil 7.17'de gösterilen CV grafiği ele alındığında katot akımlarında meydana gelen değişimin birbirine oldukça yakın olduğu görülmekte iken, anot akımlarında meydana gelen değişimin daha ayırt edilebilir olduğu da anlaşılmaktadır.



Şekil 7.16: 10E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.



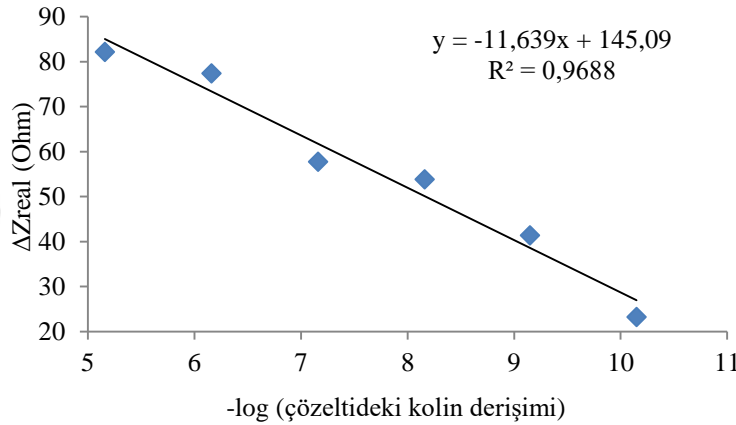
Şekil 7.17: 10E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.

Çizelge 7.5, RdxPBS çözeltisi içinde E-11 M ile E-6 M aralığında değişen kolin miktarlarına karşı R_{ct} ve empedans değişim değerlerini ifade etmektedir. Çözelti içerisindeki kolin derişiminin artışıyla R_{ct} ve empedans değişimlerinin de arttığı görülmektedir.

Çizelge 7.5: 10E-1ChMPGE elektrodunun EIS verileri.

Kolin Derişimi (M)	$\Delta Z(\text{real})$ (Ω)	R_{ct} (Ω)
E-11	87,1114	24,9204
E-10	105,3027	30,2761
E-9	117,7353	34,1666
E-8	121,6689	35,4279
E-7	141,2722	42,4304
E-6	146,0306	43,4237

Şekil 7.18’de verilen regresyon eğrisine göre, 10E-1ChMPGE elektrodunun %96.88 başarıyla kolin tespiti yapabildiği görülmektedir.

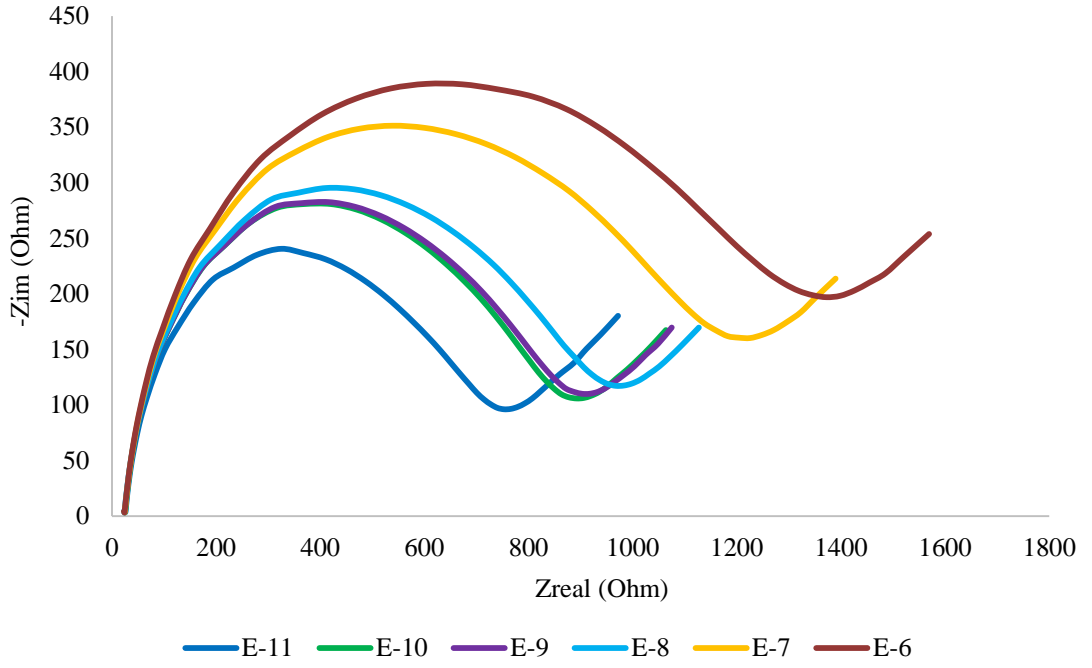


Şekil 7.18: 10E-1ChMPGE elektrodunun kalibrasyon eğrisi.

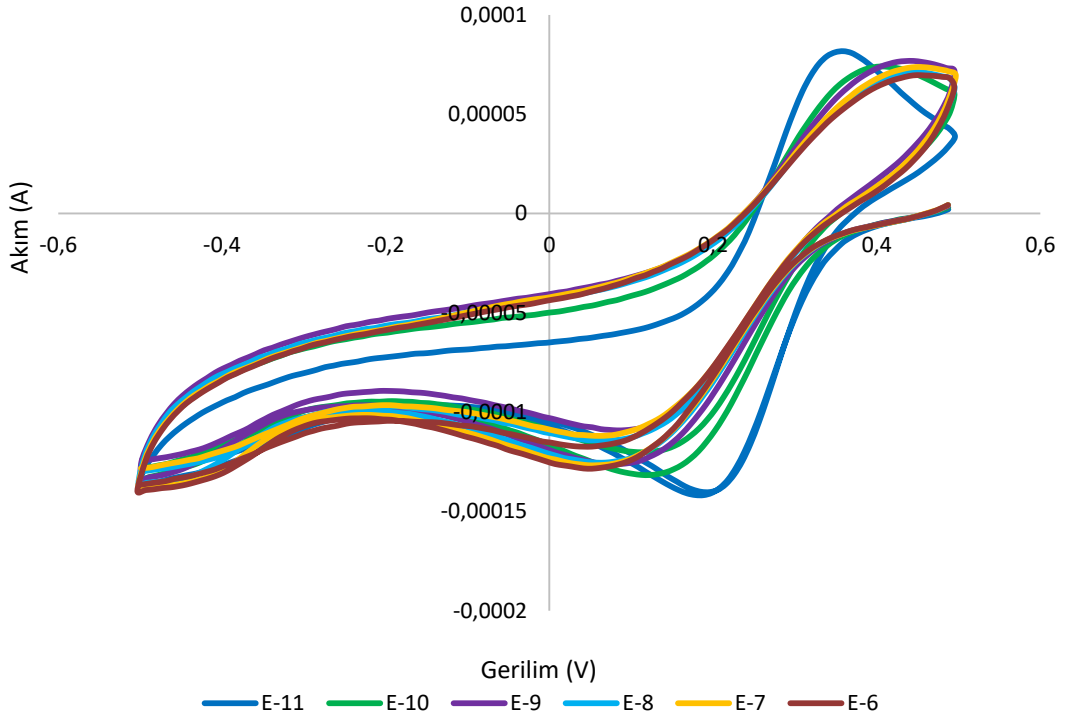
Şekil 7.19’da belirtilen grafik, 20E-1ChMPGE elektrodunun değişen çözelti derişimlerindeki davranışını göstermektedir. Elde edilen grafik neticesinde, E-11 M ile E-6 M aralığındaki kolin derişimlerini tespit edebilen bir elektrot elde edildiği söylenebilir. E-10 M ve E-9 M çözültülerinin değerlerin birbiriyle hemen hemen aynı olması, hazırlanan elektrodun E-10 M ile E-9 M arasındaki kolin derişimlerinin ayrıştırılmasında kullanımını zorlaştırmaktadır. Bu aralık dışında kalan değerler için 20E-1ChMPGE elektrodu kullanılabilir.

Baskılama yapılan PGE’lerin yüzeyine tutunan kolin molekülleri, çözelti derişiminin artmasıyla artış göstermekte ve yük transferinin engellenmesine neden olmaktadır.

Bu durum Şekil 7.20’de görüldüğü gibi indirgenme ve yükseltgenmeden kaynaklı oluşan piklerin düşmesine neden olmaktadır.



Şekil 7.19: 20E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.



Şekil 7.20: 20E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki CV sonucu.

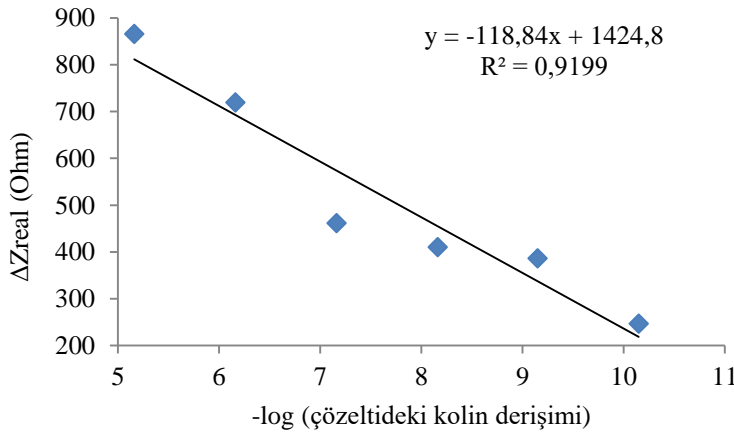
Şekil 7.20 göz önüne alındığında CV grafiklerinde meydana gelen değişimin düzenli olmaması kolin molekülünün bozulmaya uğrayarak, iletken olmayan oluşumların (trimetilamin, hidrojen veya klor gazı gibi) meydana gelmesiyle açıklanabilir. Ayrıca anot ve katot pik akımlarının farklı olması, dönüş akımlarının değişmesi ve hücre potansiyelinin düşmesi, kolin molekülünün bozulmaya uğradığını göstermektedir [95].

Çizelge 7.6'da, 20E-1ChMPGE elektrodunun çözeltideki kolin miktarındaki farklılığa karşı empedansında meydana gelen değişim yer almaktadır. Bu değişimler kullanılarak yapılan regresyon analizine göre bu elektrodun kolin tespitindeki başarısı %91.99 olarak bulunmuştur.

Çizelge 7.6: 20E-1ChMPGE elektrodunun EIS verileri.

Kolin Derişimi (M)	$\Delta Z(\text{real})$ (Ω)	R_{ct} (Ω)
E-11	246,4205	240,5402
E-10	385,8198	280,7636
E-9	410,2062	282,5404
E-8	461,4373	295,2759
E-7	719,0356	351,3110
E-6	865,9407	388,9798

20E-1ChMPGE elektrodunun, kolin tespitindeki başarı oranının düşük olması (Şekil 7.20) bu elektrodun daha sonra kan serumunda yapılan çalışmalarda kullanımını kısıtlayan bir faktör olmaktadır.



Şekil 7.21: 20E-1ChMPGE elektrodunun kalibrasyon eğrisi.

Moleküler baskılamada kullanılan polimer sayesinde elektrodun iletkenliği artırılırken, bu artış sistem davranışında herhangi bir değişikliğe yol açmamaktadır. İncelenen çözeltilerde kolin derişiminin artırılması moleküler baskılama yapılan

elektrotlarda daha fazla kolin molekülünün adsorpsiyonuna neden olmaktadır. Bu durum $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ 'ün yük transferini engelleyerek R_{ct} 'nin artmasını sağlamasıyla elde edilmektedir. Elde edilen EIS verileri, denklem 3.7'de de ifade edildiği gibi, sistem kapasitansının, kolin derişiminin artmasıyla azaldığını göstermektedir.

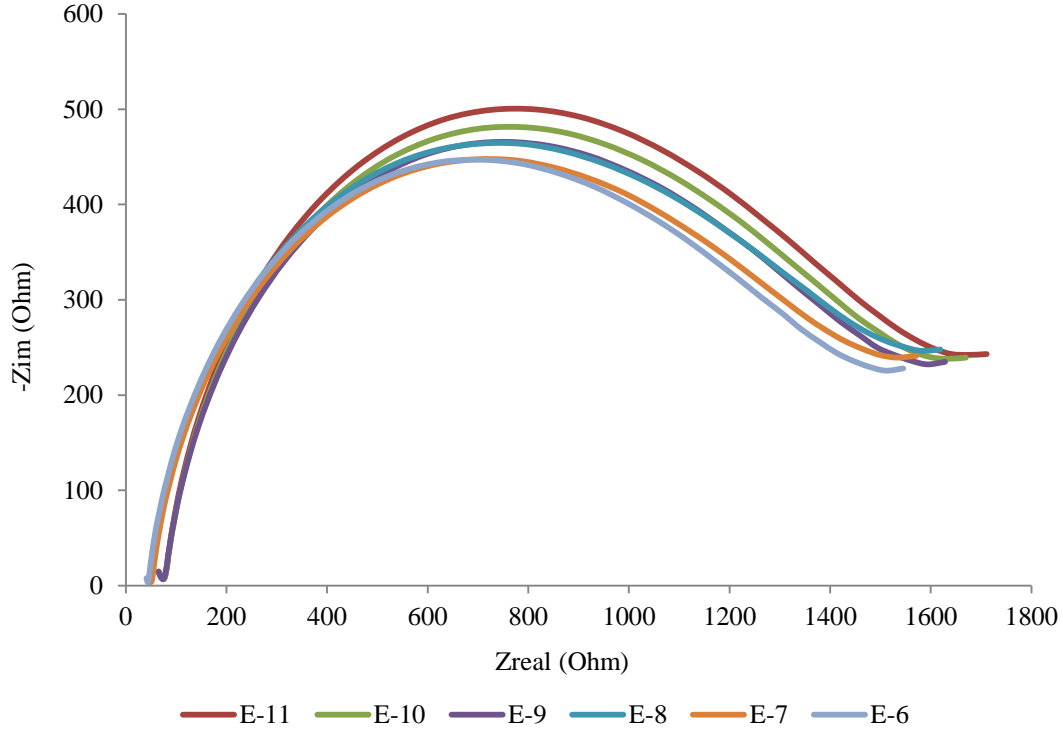
Bu aşamadan sonra, E-11 M ile E-6 M aralığında kolinin ayrıştırılabilir şekilde tespitini en iyi şekilde yapan elektrotlar, EIS grafikleri ve regresyon eğrileri göz önüne alınarak belirlenmiş ve bu elektrotların kan örneğindeki sonuçları incelenmiştir. Elektrotlar belirlenirken EIS grafiği üzerinde oluşan yarım daireler ve R^2 değerleri dikkate alınarak 2E-1ChMPGE ve 5E-1ChMPGE elektrotları bu aralıkta en etkin ayrıştırma yapan elektrotlar olarak seçilmiştir. Seçilen elektrotların kan serumundaki davranışları incelenmiştir.

7.3 Elektrotların Spesifisite Analizleri

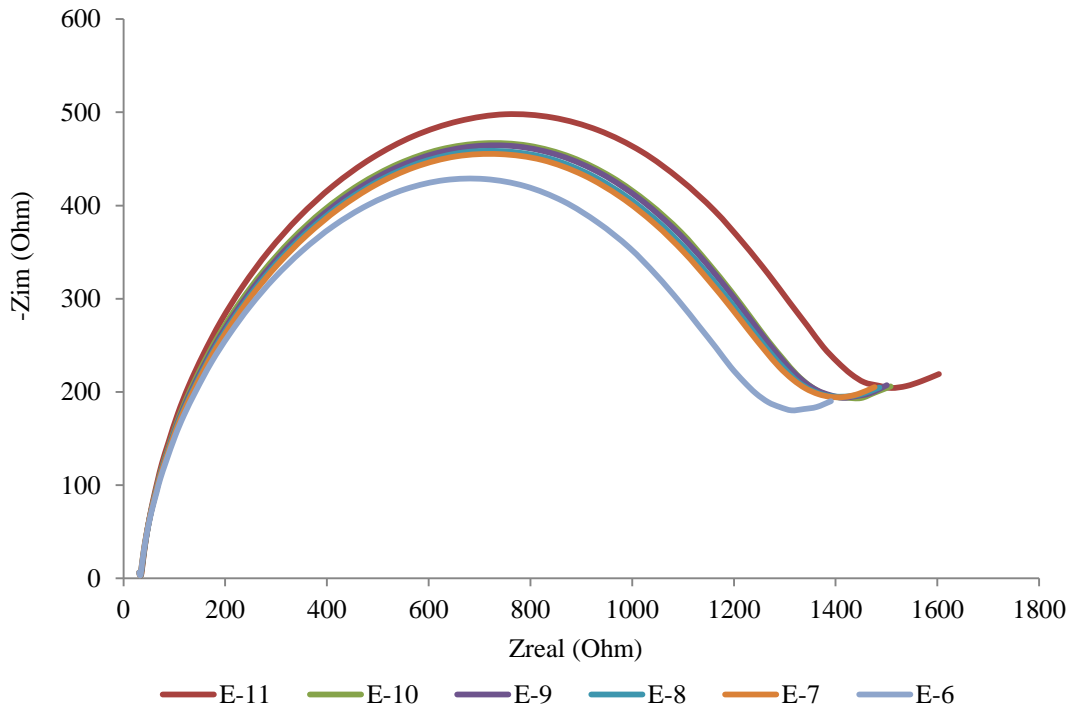
Elektrotların EIS ve CV yanıtlarının koline özgü olduğunun gösterilmesi amaçlanarak, farklı moleküllere verdiği yanıtların incelenmesi için spesifisite analizi yapılmıştır. Spesifisite analizi, kimyasal formülü $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_3\text{OH})$ olan TRIS (hidroksimetil)aminometan bileşiği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İlk kez 1946'da Gomori tarafından tanıtılan TRIS, biyokimya ve moleküler biyolojide tampon çözeltilerin bileşeni olarak yaygın şekilde kullanılan ve organik bileşik sınıfında yer alan bir amino alkoldür [96,97]. TRIS beyaz kristal toz halde bulunur ve suda yüksek çözünürlüğe sahiptir [98].

Kan serumunda analiz yapılması için belirlenen 2E-1ChMPGE ve 5E-1ChMPGE elektrotlarının RdxPBS çözeltisi içine eklenen kolinle aynı mol sayısına sahip altı farklı molde TRIS içeren çözeltiyle analizi yapıldığında Şekil 7.22 ve 7.23'teki yanıtlar elde edilmiştir.



Şekil 7.22: 2E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde TRIS içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.



Şekil 7.23: 5E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde TRIS içeren çözeltilerdeki EIS sonucu.

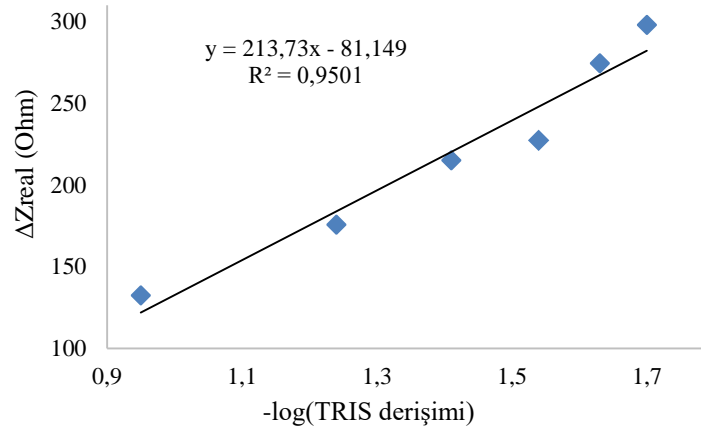
EIS yanıtları incelendiğinde, RdxPBS içinde TRIS'in artan mol sayısına karşı R_{ct} değerlerinin azaldığı görülmektedir. Bu durum, eklenen TRIS'in elektrotlarda yer alan kolin boşluklarına tutunmadığını ve çözeltide kalarak çözeltinin iletkenliğini

arttırdığını göstermektedir. Artan çözelti iletkenliğiyle geçen akımın arttığı ve böylelikle empedansın beklendiği şekilde azaldığı görülmüştür.

Spesifisite yanıtlarından elde edilen R_{ct} değerleri ve empedans değişimleri Tablo 7.7 ve Tablo 7.8’de gösterilmektedir. Bu veriler ışığında yapılan analiz sonucunda Şekil 7.24’te 2E-1ChMPGE elektrotu için %95.01, Şekil 7.25’te 5E-1ChMPGE elektrotu için %94.54 oranında başarılı bir spesifisite analizi gerçekleştirildiği söylenebilmektedir.

Çizelge 7.7: 2E-1ChMPGE elektrodunun TRIS çözeltisindeki EIS verileri.

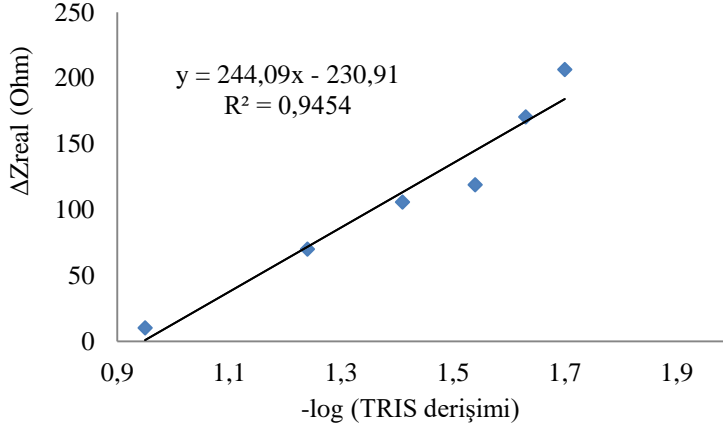
TRIS Derişimi (M)	$\Delta Z(\text{real})$ (Ω)	R_{ct} (Ω)
E-11	132,4716	257,5648
E-10	175,8398	243,2814
E-9	215,2587	233,4960
E-8	227,2441	217,7406
E-7	274,6086	208,0688
E-6	297,9614	201,3783



Şekil 7.24: 2E-1ChMPGE elektrodunun TRIS çözeltisinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Çizelge 7.8: 5E-1ChMPGE elektrodunun TRIS çözeltisindeki EIS verileri.

TRIS Derişimi (M)	$\Delta Z(\text{real})$ (Ω)	R_{ct} (Ω)
E-11	10,1981	293,6328
E-10	69,9320	273,2999
E-9	105,8290	269,6799
E-8	118,9517	262,9134
E-7	170,5295	260,4920
E-6	206,5657	248,0781



Şekil 7.25: 5E-1ChMPGE elektrodunun TRIS çözeltisinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.

7.4 Elektrotların Kan Serumunda Analizi

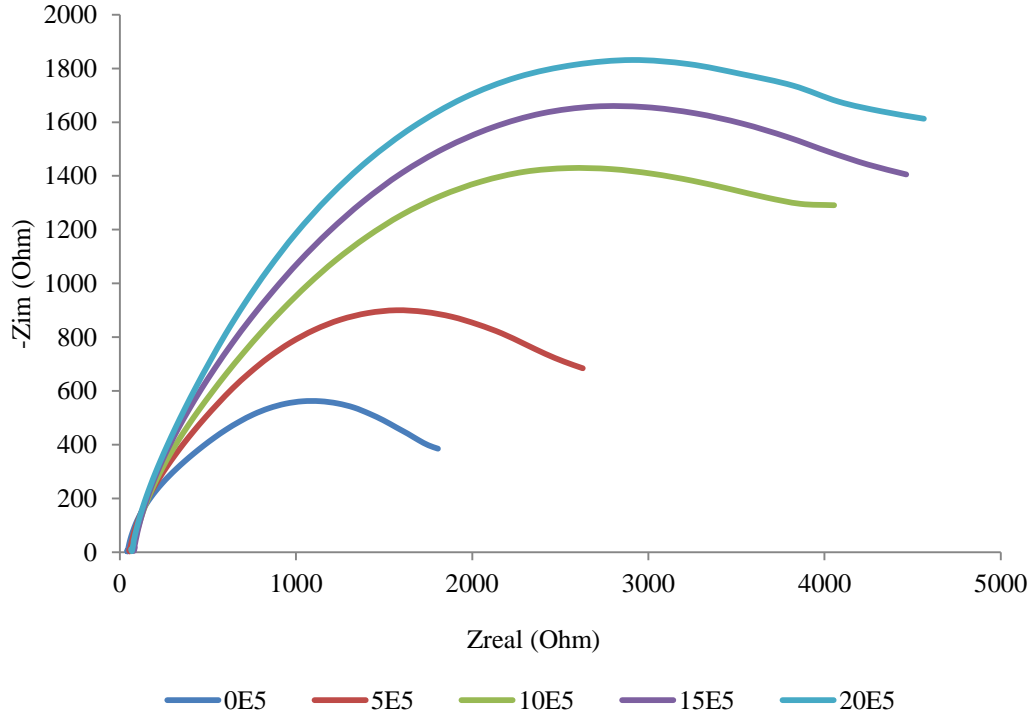
Kolin-MIP biyosensörlerinin klinik uygulamalar için güvenilirliğini ve uygulanabilirliğini araştırmak için kalem grafit elektrotların insan serum örneğinde analizleri yapılmıştır.

Serum, enzimler, hormonlar antikorlar gibi çok sayıda biyolojik madde içerir. pM seviyesinde kolin tespiti, oluşturulan biyosensörlerin yüksek algılama hassasiyetine sahip olduğunu göstermektedir. İnsan serum örneğinin büyük ölçüde seyreltilse bile elektrotta ilgili boşluklara tutanabilecek proteine ya da ilgili moleküle sahip olacağı ve spesifik olmayan bağlanmayı minimize edeceği varsayılmıştır [99]. Serumun seyreltilerek kullanımı duyarlılık ve seçicilikte bir kayıp oluşturmadığı için biyosensörlerin seyreltilmiş insan serumunda kullanılabilmesi düşünülmektedir [68].

Kandaki kolin miktarının tespitine yönelik yapılan analizler Şekil 6.5'te belirtildiği gibi standart katma metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Beş deney kabında eşit hacimde (0.5 mL) serum bulunurken, değişen miktarlarda (5, 10, 15 ve 20 mL) standart (E-5 çözeltisi) yer almaktadır. Standart miktarının değişimine bağlı olarak elektrokimyasal ölçümler yapıp Şekil 7.26 ve Şekil 7.28'de belirtilen EIS grafikleri elde edilmiştir. 2E-1ChMPGE ve 5E-1ChMPGE elektrotları için ilave edilen standart hacmine (mL) karşı empedans verileri (Ohm) kullanılarak Şekil 7.27 ve Şekil 7.29'da belirtilen regresyon eğrileri oluşturulmuştur.

Şekil 7.26'da 2E-1ChMPGE elektrodu için ve Şekil 7.28'de 5E-1ChMPGE elektrodu için belirtilen EIS sonuçları kan serumunda bulunan kolinin bağlandığını göstererek artan kolin konsantrasyonu ile empedans arasındaki bağıntıyı ifade etmektedir.

Ayrıca, bağlanan kolin moleküllerinin uzaklaştırılarak elektrotların tekrar kullanılabilirliğinin sağlanması için her analiz sonunda elektrotlar 0.1 M HCl ve deiyonize su içinde yıkanmıştır.



Şekil 7.26: 2E-1ChMPGE elektrodunun seyreltilmiş kan serumundaki EIS sonucu.

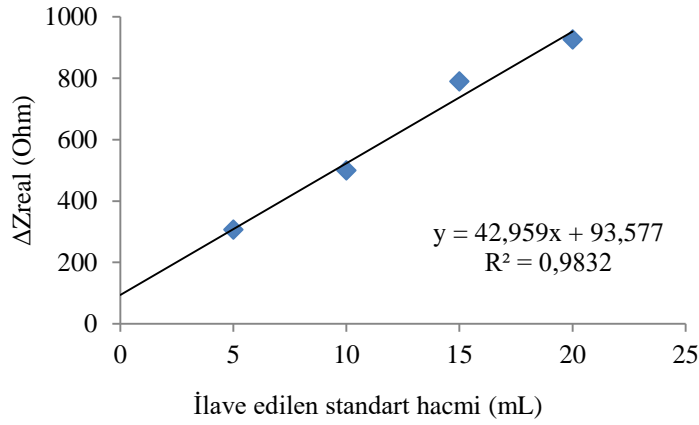
Şekil 7.26'daki 2E-1ChMPGE elektroduna ait EIS grafiğine bakıldığında R_{ct} değerlerinin düzenli şekilde arttığı görülmektedir. İlave edilen standart miktarına karşı elektrodun empedans ve R_{ct} değerlerindeki değişimi Çizelge 7.9'da görülmektedir. Buradaki değerler baz alınarak çizilen regresyon eğrisi, bu elektrodun analizde başarılı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 7.9: 2E-1ChMPGE elektrodunun kan serumundaki EIS verileri.

İlave edilen standart miktarı (mL)	$\Delta Z(\text{real}) (\Omega)$	$R_{ct} (\Omega)$
5	306,65454	1105,60852
10	499,85376	1175,62805
15	789,75684	1291,47705
20	926,00830	1300,41089

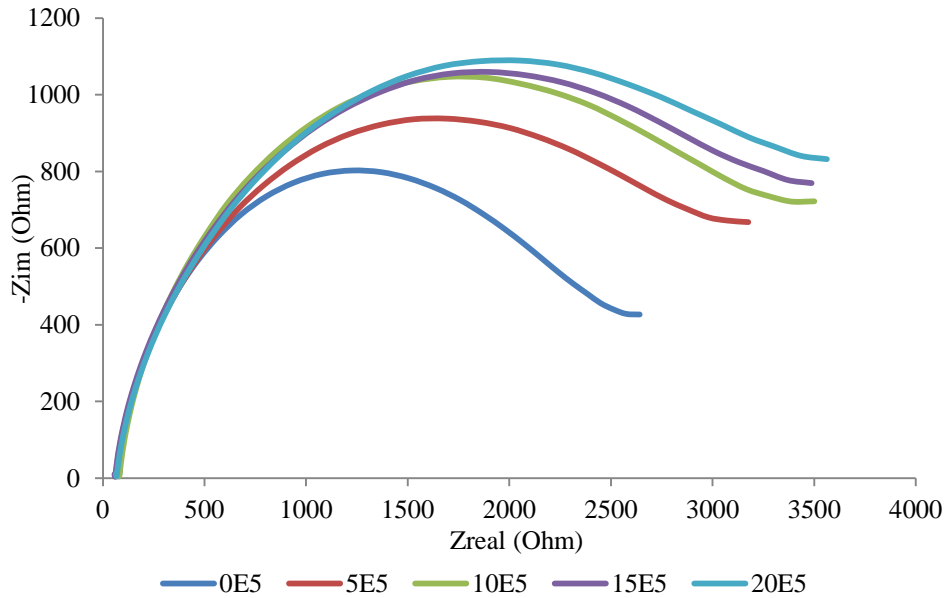
2E-1ChMPGE elektrodunun standart katma metoduyla analizi sonucunda Şekil 7.27'de %98.32 başarıyla çalışmayı gerçekleştirdiği görülmektedir. RdxPBS içine eklenen standart miktarı arttıkça, kolin miktarı da artmakta ve buna bağlı olarak elektrot yüzeyinde daha fazla tutunma olmaktadır. Elektrot yüzeyindeki kolin tanıma

bölgelerine daha fazla kolinin tutunması, empedans ve R_{ct} değerlerinde de artışa neden olmaktadır.



Şekil 7.27: 2E-1ChMPGE elektrodunun kan serumundan elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Standart katma metodu kullanılarak kan serumundaki kolın miktarının tespit edilmesine yönelik seçilen diğer elektrot olan 5E-1ChMPGE elektrodunun Şekil 7.28’de elde edilen EIS sonucu ele alındığında empedansın düzenli bir şekilde arttığı görülmektedir.



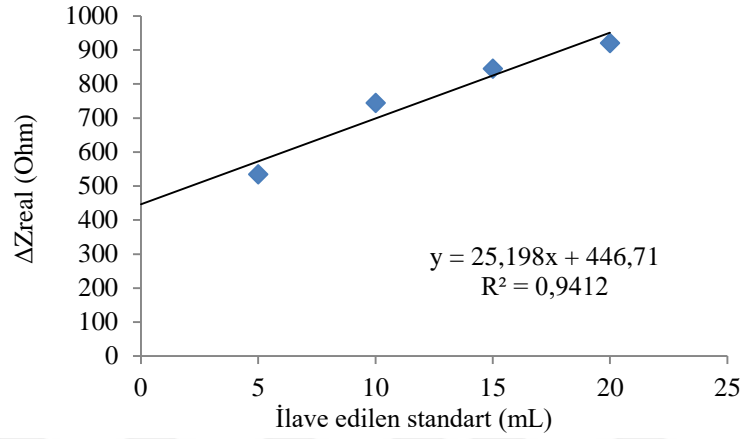
Şekil 7.28: 5E-1ChMPGE elektrodunun seyreltilmiş kan serumundaki EIS sonucu.

Artan kan serumuna bağlı olarak 5E-1ChMPGE elektrodunda meydana gelen empedans ve R_{ct} değerindeki değişimi Çizelge 7.10 ifade etmektedir. Bu çizelge incelendiğinde ilave edilen standart miktarının artmasıyla empedans değerlerinin arttığı görülmektedir. Şekil 7.29’da gösterilen regresyon analizi göz önüne

alındığında, bu tez çalışması kapsamında 5E-1ChMPGE elektrodunun %94.12 başarı oranıyla analizi gerçekleştirdiği görülmektedir.

Çizelge 7.10: 5E-1ChMPGE elektrodunun kan serumundaki EIS verileri.

İlave edilen standart miktarı (mL)	$\Delta Z(\text{real})$ (Ω)	R_{ct} (Ω)
5	534,54395	937,71436
10	745,36231	1046,71436
15	845,80078	1059,43689
20	921,03198	1089,14282



Şekil 7.29: 5E-1ChMPGE elektrodunun kan serumundan elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Kan serumu içinde bilinmeyen kolin derişimini saptamak için uygulanan standart katma metodunda, denklem 6.9 kullanılarak yapılan analit derişimi hesabına göre, serum içinde $10.64 \pm 0.546 \mu\text{M}$ kolin olduğu tespit edilmiştir. Kan serumunda yapılan çalışmaların sonucunda kandaki kolin miktarının $10.64 \pm 0.546 \mu\text{M}$ olarak tespit edilmesiyle, vücutta bulunan kolinin 7-10 μM seviyesinde olduğu göz önüne alındığında başarılı bir sonuca ulaşıldığı söylenebilmektedir.



8. TARTIŞMA

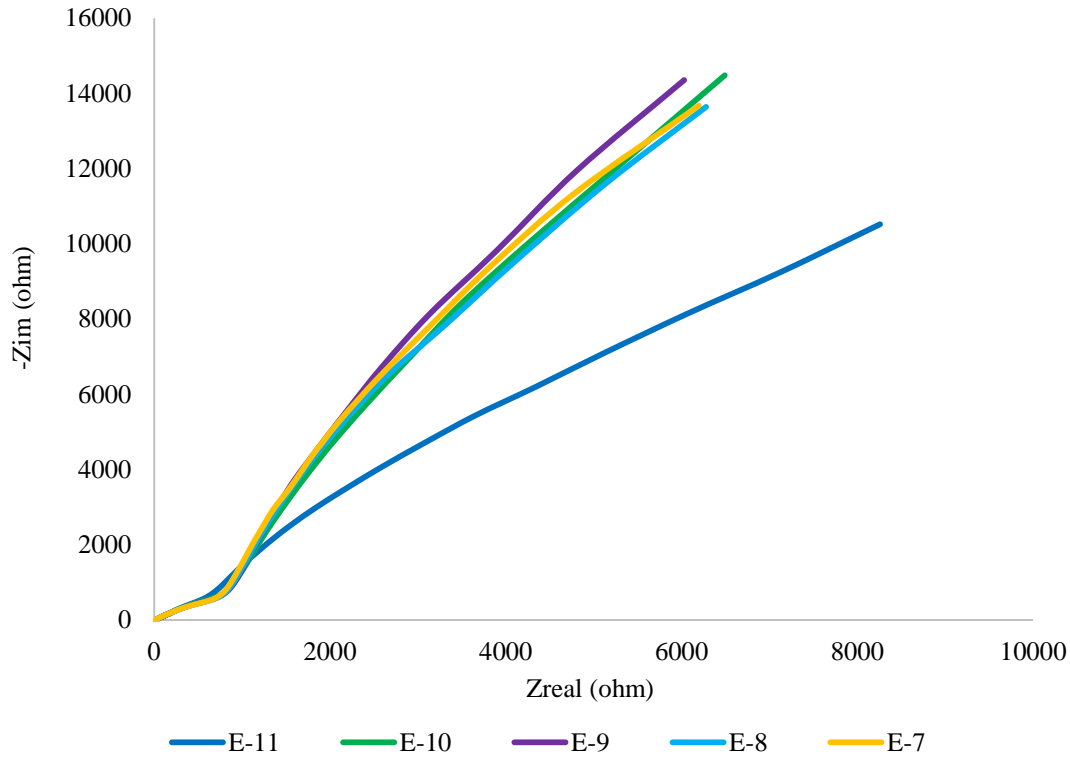
Bu tez çalışmasında koline duyarlı impedimetrik biyosensör geliştirilmesi hedeflenmiş ve bunun için altı grup olacak şekilde moleküler baskılama yöntemiyle kalem grafit elektrotlar üzerine kolin baskılanmasıyla elektrotlar elde edilmiştir. Gruplar; yalın halde, kolin içermeyen MAGA polimeri baskılanarak ve dört farklı derişimde kolin baskılanarak hazırlanmıştır. İlk olarak ABS çözeltisi içinde elektrotların optimizasyonu yapılmıştır. ABS çözeltisi içinde yapılan ön çalışmanın sonucunda elde edilen akım değerlerinin farklılık göstermesi grafit elektrodun yüzey özelliklerinden ve bileşenlerinden kaynaklı olduğu söylenebilir. Altı gruptan oluşan elektrotların ABS çözeltisinde optimize edilmesinin ardından değişen derişimlerde kolin içeren PBS çözeltisinde ve kan serumunda elektrokimyasal analizleri yapılmıştır. ABS ve PBS çözeltileri hazırlanırken, suyun iletkenliğini minimuma indirmek için deiyonize su kullanılmıştır. Böylelikle elektrotlar arasındaki iletkenliğin hazırlanan çözeltilerden kaynaklı hale gelmesi sağlanmıştır. PBS çözeltisi hazırlanırken kullanılan $K_3[Fe(CN)_6]^{-3/4}$ redoks çifti ise çözeltinin redoks potansiyelini arttırmıştır.

Önceki çalışmalarda, 3 farklı molaritede (en yüksek E-1 M) kolin konsantrasyonunun baskılanması sonucu elektrotların verdiği cevap incelenerek elektrot yüzeyindeki kolin boşluğunun az olması nedeniyle kolin seçiciliğinin, düşük konsantrasyonda kolin baskılanmış elektrotlarda daha az olduğu görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarda yarım dairelerin çaplarının bütün çözeltilerde hemen hemen aynı olduğu, yalnızca E-11 M ile E-10 M ile ifade edilen yarım dairelerin çaplarının ayırt edilebilir düzeyde olduğu ifade edilmiştir. E-1ChMPGE elektrodu, E-11 M ile E-10 M derişimlere sahip çözeltileri ayırt etmede kullanılabilirken E-10 M'dan daha yüksek derişimlerdeki çözeltilerde iyi ayrışma yapamadığı gözlemlenmiştir [78].

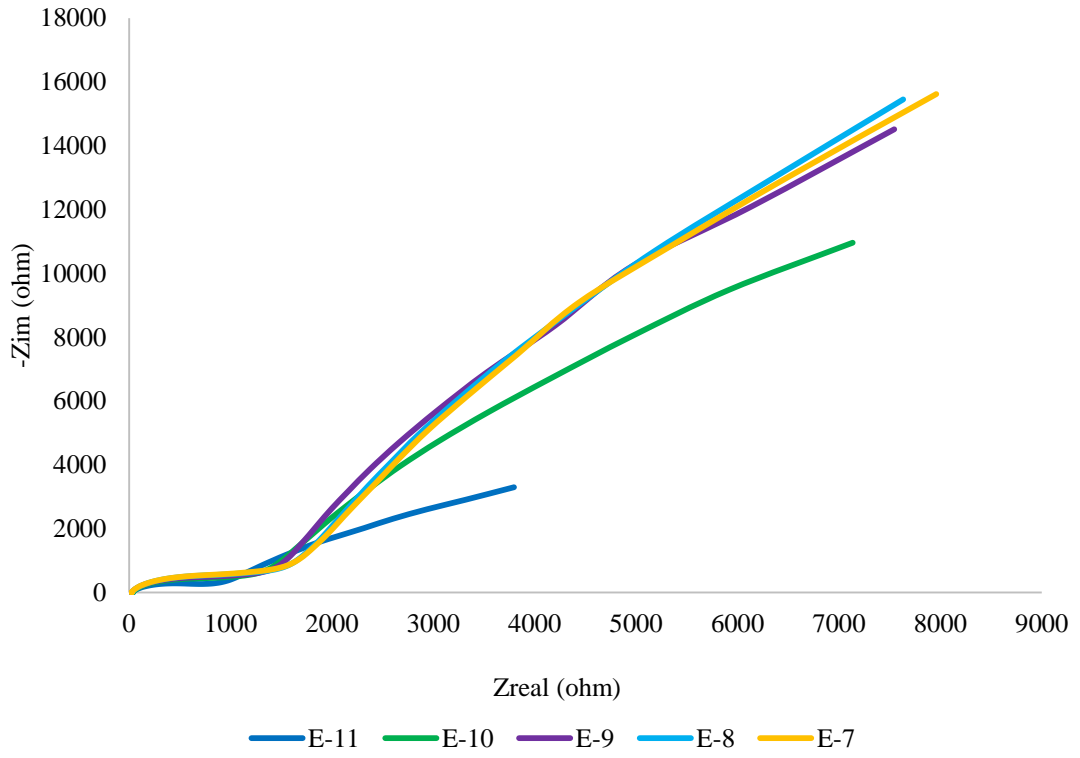
Şekil 8.1, Şekil 8.3 ve Şekil 8.5 sırasıyla E-5ChMPGE, E-3ChMPGE ve E-1ChMPGE elektrotlarının EIS yanıtlarını ifade etmektedir. Bu elektrotlarda, elektrotlar üzerinde bulunan kolin boşluklarının az olması nedeniyle, yüzeye kolinin tutunmasının daha az olduğu görülmüştür. PGE'ler üzerindeki şablonların düşük

molaritede kolin içeren çözeltilerde dolması nedeniyle, elektrotların belirli bir noktadan sonra doygunluğa ulaştığı ve bu nedenle ayrıştırma yeteneğinin az olduğu görülmektedir [78]. Elektrotlar üzerinde daha az şablon molekülünün bulunması daha az elektron transferine yol açmaktadır. EIS grafiklerinin doğrusal kısmı çözelti içinde meydana gelen difüzyon sürecini ifade etmektedir. Şekil 8.1, Şekil 8.3 ve Şekil 8.5'teki grafiklerin difüzyon kısmına bakılarak kapasitans değerleriyle ilgili analiz yapılabilirken, yarım daire çaplarında değişiklik olmadığından elektrotta meydana gelen empedans değerlerinin değişimleri ile ilgili analiz yapılamamaktadır.

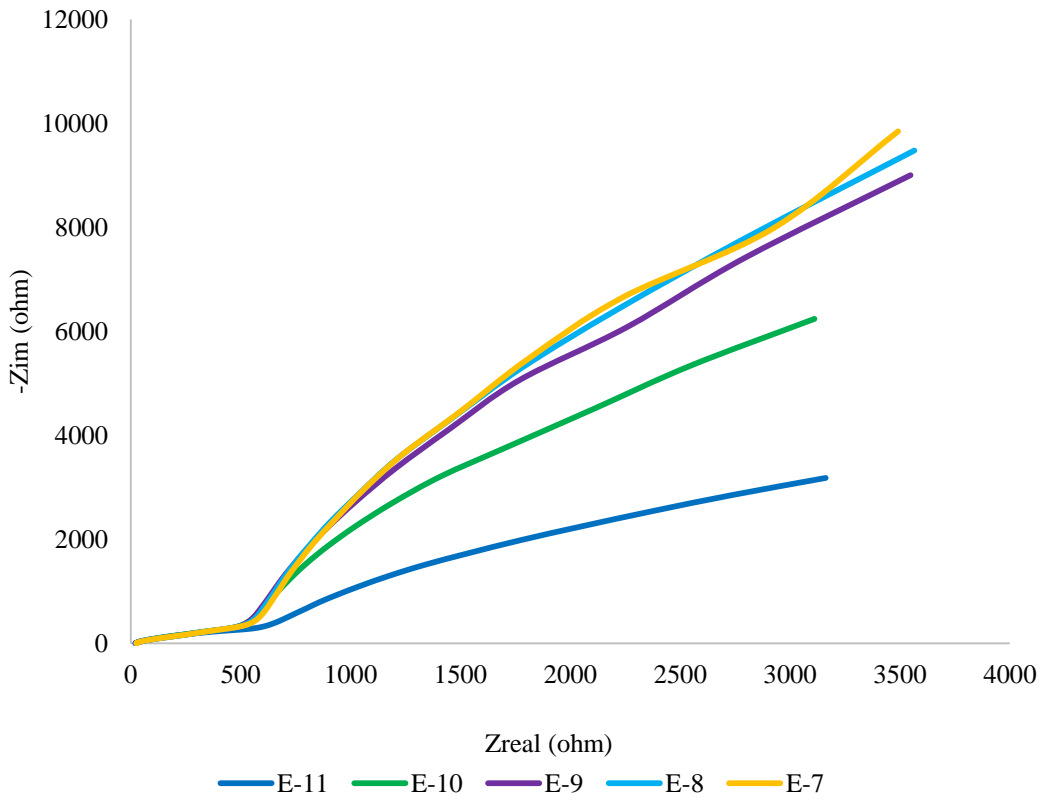
Bu tez çalışmasında, elektrotlara baskılanacak en düşük kolin derişimi olarak E-1 M'nin iki katı olan 2E-1 M seçilerek deneylere başlanmıştır. Diğer baskılanacak kolin derişimleri de 5E-1 M, 10E-1 M ve 20E-1 M şeklinde arttırılarak elektrotlar üzerinde daha yoğun kolin boşluklarının oluşturulması hedeflenmiştir. Yüzeyde oluşturulan kolin tanıma bölgelerinin arttırılması, bu bölgelere daha fazla kolinin tutunmasına olanak sağlamış olsa da empedans ve R_{ct} değerlerindeki değişimin baskılama derişiminin artmasıyla aynı oranda arttığı söylenememektedir. Dört farklı derişimde yapılan baskılama sonucunda, çözeltideki değişime en iyi yanıt veren elektrotların 2E-1ChMPGE ve 5E-1ChMPGE elektrotları olduğu tespit edilmiş ve kan serumuyla yapılan analizler için bu iki elektrot kullanılmıştır.



Şekil 8.1: E-5ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu [78].



Şekil 8.2: E-3ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu [78].



Şekil 8.3: E-1ChMPGE elektrodunun farklı derişimlerde kolin içeren çözeltilerdeki EIS sonucu [78].

Ayrıca baskılanacak kolin derişiminin iki katına çıkarılmasıyla, Şekil 8.3 ile karşılaştırıldığında Şekil 7.10'da, elektrotta meydana gelen değişimi ifade eden yarım dairelerin açık bir şekilde oluştuğu görülmüştür. Baskılanan kolin derişimindeki artışın, EIS analizindeki yarım dairelerin oluşmasında negatif bir etkiye sahip olmadığı da görülmüştür.

Çizelge 8.1 negatif kontrol grubuna ve dört farklı molaritede kolin kaplı elektrotlara ait regresyon analiziyle elde edilen verileri, ortalama R_{ct} değerlerini ve tespit sınırlarını ifade etmektedir. Bu çizelge göz önüne alındığında 20E-1ChMPGE elektrodunun tayin sınırlarının istenilen aralıkta olmasına rağmen R^2 değerinin düşük olması bu elektrodun kan serum analizinde tercih edilmemesine yol açmıştır. 10E-1ChMPGE elektrodunun R^2 değerinin yüksek olması fakat tayin sınırının istenilen aralıkta olmaması bu elektrotun kullanımı için dezavantaj oluşturmaktadır. R^2 değerlerinin yüksek olması ve analiz edilen aralıkta yeterli kolin tayini yapabilmesi nedeniyle daha sonraki aşama olan kan serumunda kullanılmak üzere 2E-1ChMPGE ve 5E-1ChMPGE elektrotları tercih edilmiştir. Kan serumunda yapılan analiz sonucunda ise 2E-1ChMPGE elektrodunun kolin tespitindeki performansının 5E-1ChMPGE elektroduna göre daha iyi olması nedeniyle bu çalışma sonucunda 2E-1ChMPGE elektrodunun kan serumunda kolin tespiti için rahatlıkla kullanılabilceği görülmüştür.

Çizelge 8.1: Elektrotların regresyon analizlerinin ve tayin aralıklarının karşılaştırılması.

Elektrot	R^2	y	DR	Ortalama R_{ct} (Ω)
Negatif	0,9275	$y = 674,86x - 383,85$		302,1113
Pozitif	0,6581	$y = 3088,7x - 3477,9$		663,2303
2E-1	0,9796	$y = -9,5493x + 112,79$	71,6 pM-7,16 μ M	122,0467
5E-1	0,9798	$y = -8,337x + 99,589$	71,6 pM-7,16 μ M	29,4109
10E-1	0,9688	$y = -11,639x + 145,09$	71,6 pM-7,16 nM	35,1075
20E-1	0,9199	$y = -118,84x + 1424,8$	71,6 pM-7,16 μ M	306,5685

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, kolin miktarları bakımından Çizelge 8.2'de verilen literatür çalışmalarıyla karşılaştırılmıştır. İlgili çizelge farklı yöntemler kullanılarak elde edilen kolin tespit sınırlarını göstermektedir. Bu çalışma kapsamında, 71.6 pM-7.16 μ M aralığındaki kolin miktarları tespit edilebilmektedir.

Çizelge 8.2: Kolin tayini için yöntem ve tayin aralıklarının özeti.

Tespit Yöntemi	Tayin Aralığı (DR)	Kaynakça
Radyoenzimatik tahlil	5 pmol	[100]
Kimyasal ışınma	30 fmol	[101]
AChE/ChO ile değiştirilmiş Pt mikroelektrotta EC	100 amol	[102]
ESI-izotop seyreltme MS	1-40 pmol	[103]
Redoks polimer/peroksidaz kaplı karbon elektrotta EC	5fmol/10 µL	[104]
ChO modifiye Pt elektrot	12 fmol	[105]
Termospray iyonlaşması	30 pmol	[106]
Hızlı atom bombardımanı	5 pmol	[107]
ESI (Elektrospray iyonlaşması)	0.3 pmol	[108]
Kütle spektrometresi (MS)	0.3 fmol	[109]
Radyoenzimatik tahlil	5 pmol	[110]
Elektrokimyasal	0.2 µM	[111]
Işınma	0.5 µM	[112]
Elektrokimyasal ışınma	0.5 pmol (0.05 µM)	[113]
Elektrokimyasal	10 µM	[114]
Biyosentrivoltametri	0.1-500 µM	[115]
Amperometrik	0.5 µM	[116]
Enzimatik-Spektrofotometrik	1.6 mg/L	[117]
Bu çalışma	7.16 pM	

Çizelgede verilen literatür çalışmalarıyla kıyaslandığında, bu tez çalışmasında kullanılan moleküler baskılama yöntemi ile gerçekleştirilmiş PGE'lerin kolin tespiti için kolay uygulanabilir ve ekonomik bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, kolin tespiti için tercih edilen moleküler baskılama yönteminin, özellikle kolay uygulanabilir ve ekonomik olması, kısa sürede ve geniş bir tespit sınırında ölçüm yapabilmesi sebebiyle Çizelge 8.2'de literatürdeki birçok elektrokimyasal

çalışmadan üstün olduğu görülmektedir. Ayrıca, belirtilen kolin tespit yöntemleri ve tayin aralığı göz önüne alındığında, bu çalışmadaki tayin aralığı olan 71.6 pM-7.16 μ M'den daha düşük aralıkta kolin tespit eden başka yöntemler olduğu görülmektedir. Fakat PGE üretiminin maliyetinin daha düşük olması, analiz süresinin 4.5-5 dakika arasında olması ve tayin aralığının geniş olması bu çalışmada geliştirilen biyosensörün kolin tespitinde etkili bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca kan serumunda yapılan çalışmaların sonucunda kandaki kolin miktarının $10.64 \pm 0.546 \mu$ M olarak tespit edilmesiyle ve vücutta bulunan kolin miktarının 7-10 μ M seviyesinde olduğu göz önüne alınmasıyla başarılı bir sonuca ulaşıldığı söylenebilmektedir. Bu çalışmada, tayin sınırının yeterli olduğu söylenebilirken daha sonraki çalışmalarda kolin tayin süresini kısaltmak için farklı analiz yöntemleri ve frekans aralığı kullanılarak, daha verimli çalışacak point-of-care cihazı geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Karpuz, G.** (2013). *Polipirol-Paratoluensülfonat (Pt/PPy-pTS) Filme Ürikaz Enziminin İmmobilizasyonu İle Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması* (Yüksek Lisans Tezi). Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [2] **Blum, L. J., & Coulet, P. R.** (1991). *Biosensor principles and applications*. M. Dekker.
- [3] **Turner, A., Karube, I., & Wilson, G. S.** (1987). *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford university press.
- [4] **Ustabaş, S.** (2010). *Glukoz Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması* (Yüksek Lisans Tezi). Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [5] **Telefoncu, A.** (1999). Biyosensörlere Genel Bakış. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu'nda sunuldu, Kuşadası, 1-9.
- [6] **Azhar, M., & Dendukuri, D.** (2017). Microfluidic platforms for point of care (POC) medical diagnostics, *In Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications* (s. 255-273). Woodhead Publishing.
- [7] **Silva, E. T., Souto, D. E., Barragan, J. T., de F. Giarola, J., de Moraes, A. C., & Kubota, L. T.** (2017). Electrochemical biosensors in point-of-care devices: recent advances and future trends, *ChemElectroChem*, **4**(4), 778-794.
- [8] **Point-of-Care Diagnostics Market.** Available online: <https://www.marketsandmarkets.com/MarketReports/point-of-care-diagnostic-market-106829185.html>, erişim tarihi 01.12.2018
- [9] **Özdemir, M.** (2012). *Kolin Tayini İçin Polipirol-Polivinilsülfonat Filme Kolin Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu İle Biyosensör Hazırlanması* (Yüksek Lisans Tezi). Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [10] **Ak, M.** (2013). *Sulardaki Mikroorganizmaların Belirlenmesine Yönelik Biyosensörlerin Geliştirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [11] **Akyüz, E.** (2011). *Ürik Asit Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Geliştirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- [12] **Aykut, U., Temiz, H.** (2006). Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **3**, 51-59.
- [13] **Torun, Ö.** (2011). *Gıda Örneklerinde ve Sularda Escherichia Coli Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [14] **Chambers, J. P., Arulanandam, B. P., Matta, L. L., Weis, A., Valdes, J. J.** (2008). Biosensor recognition elements, *Current Issues In Molecular Biology*, **10**, 11-12.
- [15] **Ziğal, N.** (2012). *Nanolif Kaplı Kuvars Kristal Mikroterazi Yüzeyler İle Kütle Hassas Biyosensörlerin Performansının Geliştirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [16] **Kuznetsov, B. A., Shumakovich, G. P., Koroleva, O. V., Yaropolov, A. I.** (2001). On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode, *Biosensors & Bioelectronics*, **16**(12), 73–84.

- [17] Grieshaber, D., Kenzie, R. M., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures, *Sensors*, 1400-1458.
- [18] Url-1 <http://www.novocontrol.de/php/intro_eis.php>, erişim tarihi 29.11.2018.
- [19] Tural, H., Gökçel, İ., Ertaş, N. (2003). Enstrümental Analiz I, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, No:186
- [20] Karadeniz H., Gulmez B., Sahinci F., Erdem A., Irem Kaya G., Unver N., Kivcak B., Ozsoz M. (2003). Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33, 295-302.
- [21] Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D.H., Chicarro, M., Fernandes, J. R. and Palecek, E. (1998). Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface, *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, 45, 33-40.
- [22] Dekanski, A., Stevanovic, J., Stevanovic, R., Nikolic, B. Z., Jovanovic, V. M. (2001). Glassy carbon electrodes I. Characterization and electrochemical activation, *Carbon*, 39, 1195-1205.
- [23] Harris, P. J. F. (2004). Fullerene-related structure of commercial glassy carbons, *Philosophical Magazine*, 84, 3159-3167.
- [24] Álvarez-Lueje, A., Brain-Isasi, S., Nunez-Vergara, L. J., & Squella, J. A. (2008). Voltammetric reduction of finasteride at mercury electrode and its determination in tablets, *Talanta*, 75(3), 691-696.
- [25] Skoog, D.A., West, D.A., Holler, F.J. (1996). *Analitik Kimyanın Temelleri* (E. Kılıç, F. Köseoğlu, Çev.). *Bilim Yayıncılık*, 4. baskı, 303-495.
- [26] Coverdale, R. T., Christensen, B. J., Jennings, H. M., Mason, T. O., Bentz, D. P., & Garboczi, E. J. (1995). Interpretation of impedance spectroscopy of cement paste via computer modelling. *Journal of Materials Science*, 30(3), 712-719.
- [27] Maia, L. F., & Rodrigues, A. C. (2004). Electrical conductivity and relaxation frequency of lithium borosilicate glasses, *Solid State Ionics*, 168(1-2), 87-92.
- [28] Vermoyal, J. J., Frichet, A., Dessemond, L., & Hammou, A. (1999). AC impedance study of corrosion films formed on zirconium based alloys, *Electrochimica Acta*, 45(7), 1039-1048.
- [29] Peeters, M., Eersels, K., Junkers, T., & Wagner, P. (2016). Molecularly Imprinted Polymers: synthetic receptors for diagnostic medical devices, *In Molecularly Imprinted Catalysts*, Elsevier, 253-271.
- [30] Christensen, B. J., Coverdale, T., Olson, R. A., Ford, S. J., Garboczi, E. J., Jennings, H. M., & Mason, T. O. (1994). Impedance spectroscopy of hydrating cement-based materials: measurement, interpretation, and application, *Journal of the American Ceramic Society*, 77(11), 2789-2804.
- [31] Ribeiro, D. V., Souza, C. A. C., & Abrantes, J. C. C. (2015). Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete, *Revista IBRACON de Estruturas e Materiais*, 8(4), 529-546.
- [32] Şimşek, Ç. S. (2012). *Meme Kanseri Biyomarkerleri İçin Elektrokimyasal Biyosensör Sistemleri* (Yüksek Lisans Tezi). Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

- [33] **Bandarenka, A. S.** (2013). Exploring the interfaces between metal electrodes and aqueous electrolytes with electrochemical impedance spectroscopy, *Analyst*, **138**(19), 5540-5554.
- [34] **Tai, D. F., Lin, C. Y., Wu, T. Z., & Chen, L. K.** (2005). Recognition of dengue virus protein using epitope-mediated molecularly imprinted film, *Analytical Chemistry*, **77**(16), 5140-5143.
- [35] **Vasapollo, G., Sole, R. D., Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., & Mele, G.** (2011). Molecularly imprinted polymers: present and future prospective, *International journal of molecular sciences*, **12**(9), 5908-5945.
- [36] **Huang, X., Liu, Y., Liang, K., Tang, Y., & Liu, J.** (2008). Construction of the active site of glutathione peroxidase on polymer-based nanoparticles, *Biomacromolecules*, **9**(5), 1467-1473.
- [37] **Nishino, H., Huang, C. S., & Shea, K. J.** (2006). Selective protein capture by epitope imprinting, *Angewandte Chemie International Edition*, **45**(15), 2392-2396.
- [38] **Arshady, R., & Mosbach, K.** (1981). Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, **182**(2), 687-692.
- [39] **Wulff, G.** (1972). The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates, *Angew. Chem. Internat. Edit.*, **11**(4), 341.
- [40] **Ling, T. R., Syu, Y. Z., Tasi, Y. C., Chou, T. C., & Liu, C. C.** (2005). Size-selective recognition of catecholamines by molecular imprinting on silica-alumina gel, *Biosensors and Bioelectronics*, **21**(6), 901-907.
- [41] **Wulff, G.** (1993). The role of binding-site interactions in the molecular imprinting of polymers, *Trends in biotechnology*, **11**(3), 85-87.
- [42] **Mayes, A. G., & Whitcombe, M. J.** (2005). Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers, *Advanced drug delivery reviews*, **57**(12), 1742-1778.
- [43] **Wulff, G.** (1995). Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates—a way towards artificial antibodies, *Angewandte Chemie International Edition in English*, **34**(17), 1812-1832.
- [44] **Mosbach, K.** (1994). Molecular imprinting, *Trends in biochemical sciences*, **19**(1), 9-14.
- [45] **Ikegami, T., Mukawa, T., Nariai, H., & Takeuchi, T.** (2004). Bisphenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting, *Analytica Chimica Acta*, **504**(1), 131-135.
- [46] **Trotta, F., Baggiani, C., Luda, M. P., Drioli, E., & Massari, T.** (2005). A molecular imprinted membrane for molecular discrimination of tetracycline hydrochloride, *Journal of membrane science*, **254**(1-2), 13-19.
- [47] **Uzun, L., Say, R., Ünal, S., & Denizli, A.** (2009). Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis, *Biosensors and Bioelectronics*, **24**(9), 2878-2884.
- [48] **Brüggemann, O., Haupt, K., Ye, L., Yilmaz, E., & Mosbach, K.** (2000). New configurations and applications of molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography A*, **889**(1-2), 15-24.
- [49] **Mujahid, A., Iqbal, N., & Afzal, A.** (2013). Bioimprinting strategies: From soft lithography to biomimetic sensors and beyond, *Biotechnology Advances*, **31**(8), 1435-1447.

- [50] Zahedi, P., Ziaee, M., Abdouss, M., Farazin, A., & Mizaikoff, B. (2016). Biomacromolecule template-based molecularly imprinted polymers with an emphasis on their synthesis strategies: a review, *Polymers for Advanced Technologies*, *27*(9), 1124-1142.
- [51] Hu, X., Li, G., Huang, J., Zhang, D., & Qiu, Y. (2007). Construction of Self-Reporting Specific Chemical Sensors with High Sensitivity, *Advanced Materials*, *19*(24), 4327-4332.
- [52] Hillberg, A. L., & Tabrizian, M. (2008). Biomolecule imprinting: Developments in mimicking dynamic natural recognition systems, *Irbm*, *29*(2-3), 89-104.
- [53] Xia, Y., & Whitesides, G. M. (1998). Soft lithography, *Annual review of materials science*, *28*(1), 153-184.
- [54] Nishino, H., Huang, C. S., & Shea, K. J. (2006). Selective protein capture by epitope imprinting, *Angewandte Chemie International Edition*, *45*(15), 2392-2396.
- [55] Shi, H., Tsai, W. B., Garrison, M. D., Ferrari, S., & Ratner, B. D. (1999). Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition, *Nature*, *398*(6728), 593.
- [56] Yilmaz, E., Haupt, K., & Mosbach, K. (2000). The use of immobilized templates—A new approach in molecular imprinting, *Angewandte Chemie International Edition*, *39*(12), 2115-2118.
- [57] Bandarenka, A. S. (2013). Exploring the interfaces between metal electrodes and aqueous electrolytes with electrochemical impedance spectroscopy, *Analyst*, *138*(19), 5540-5554.
- [58] Gervais, L., De Rooij, N., & Delamarche, E. (2011). Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnosics. *Advanced materials*, *23*(24), H151-H176.
- [59] Temiz, Y., Lovchik, R. D., Kaigala, G. V., & Delamarche, E. (2015). Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab?. *Microelectronic Engineering*, *132*, 156-175.
- [60] Dulay, S. B., Gransee, R., Julich, S., & Tomaso, H. (2014). Automated microfluidically controlled electrochemical biosensor for the rapid and highly sensitive detection of *Francisella tularensis*, *Biosensors and Bioelectronics*, *59*, 342-349.
- [61] Tan, H. Y., Loke, W. K., Nguyen, N. T., Tan, S. N., Tay, N. B., Wang, W., & Ng, S. H. (2014). Lab-on-a-chip for rapid electrochemical detection of nerve agent Sarin, *Biomedical microdevices*, *16*(2), 269-275.
- [62] Selvam, A. P., Wangzhou, A., Jacobs, M., Wu, T., Mohan, C., & Prasad, S. (2017). Development and validation of an impedance biosensor for point-of-care detection of vascular cell adhesion molecule-1 toward lupus diagnostics, *Future science OA*, *3*(3), FSO224.
- [63] Uludag, Y., Narter, F., Sağlam, E., Köktürk, G., Gök, M. Y., Akgün, M., Barut S. & Budak, S. (2016). An integrated lab-on-a-chip-based electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of cancer biomarkers, *Analytical and bioanalytical chemistry*, *408*(27), 7775-7783.
- [64] Brazey, B., Cottet, J., Bolopion, A., Lintel, H. V., Renaudb, P., & Gauthiera, M. (2018). Impedance based real-time position sensor for Lab-On-a-Chip devices, *Lab on a Chip*, *18*, 818-831
- [65] Uygun, Z. O., & 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: Chemicals*, **188**, 78-84.
- [66] **Albayrak, İ.** (2014). *Triptofana Duyarlı Moleküler Baskılanmış p[HEMA – MMA] Üzerinde İmpedimetrik Biyosensör Uygulaması* (Yüksek Lisans Tezi). Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- [67] **Şimşek, S., Ç.** (2012). *Meme Kanseri Biyomarkerleri için Elektrokimyasal Biyosensör Sistemleri* (Yüksek Lisans Tezi). Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- [68] **Chornokur, G., Arya, S. K., Phelan, C., Tanner, R., & Bhansali, S.** (2011). Impedance-based miniaturized biosensor for ultrasensitive and fast prostate-specific antigen detection. *Journal of Sensors*.
- [69] **Meriç, B.** (2008). *İnfluenza A Virüsünün Tanısına Yönelik Elektrokimyasal Dna Biyosensör Tasarımı* (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [70] **Soraya, G., Nguyen, T., Abeyrathne, C., Huynh, D., Chan, J., Nguyen, P., & Skafidas, E.** (2017). A Label-free, quantitative fecal hemoglobin detection platform for colorectal cancer screening, *Biosensors*, **7**(2), 19.
- [71] **Cornelis, P., Wackers, G., Thomas, I., Brand, M., Putzeys, T., Gennaro, A., Wübbenhost, M., Ingebrandt, S., & Wagner, P.** (2018). A Novel Modular Device for Biological Impedance Measurements: The Differential Impedimetric Sensor Cell (DISC). *Physica Status Solidi (a)*, **215**(15), 1701029.
- [72] **Riedel, M., Kartchemnik, J., Schöning, M. J., & Lisdat, F.** (2014). Impedimetric DNA Detection Steps Forward to Sensorial Application. *Analytical Chemistry*, **86**(15), 7867-7874.
- [73] **Murib, M. S., van Grinsven, B., Grieten, L., Janssens, S. D., Vermeeren, V., Eersels, K., Broeders, J., Ameloot, M., Michiels, L., De Ceuninck, W., Haenen, K., Schöning, M. J., & Wagner, P.** (2013). Electronic Monitoring of Chemical DNA Denaturation on Nanocrystalline Diamond Electrodes with Different Molarities and Flow Rates. *Physica Status Solidi (a)*, **210**(5), 911-917.
- [74] **Van Grinsven, B., Bon, N. V., Grieten, L., Murib, M., Janssens, S. D., Haenen, K., Schneider, E., Ingebrandt, S., Schöning, M. J., Vermeeren, V., Michiels, L., Thoelen, R., De Ceuninck, W., Wagner, P. & Ameloot, M.** (2011). Rapid assessment of the stability of DNA duplexes by impedimetric real-time monitoring of chemically induced denaturation. *Lab on a Chip*, **11**(9), 1656-1663.
- [75] **Mager, J. R., Sibley, S. D., Beckman, T. R., Kellogg, T. A., & Earthman, C. P.** (2008). Multifrequency bioelectrical impedance analysis and bioimpedance spectroscopy for monitoring fluid and body cell mass changes after gastric bypass surgery. *Clinical nutrition*, **27**(6), 832-841.
- [76] **Lehane, L., & Olley, J.** (2000). Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, **58**(1-2), 1-37.
- [77] **Nguy, T. P., Van Phi, T., Tram, D. T., Eersels, K., Wagner, P., & Lien, T. T.** (2017). Development of an impedimetric sensor for the label-free detection of the amino acid sarcosine with molecularly imprinted polymer receptors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **246**, 461-470.
- [78] **Polat, T.** (2017). *Molecular Imprinting Polymer Based Biosensor For Choline* (Bitirme Projesi). Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İstanbul.
- [79] **Nguy, T. P., Phi, T. V., Tram, D. T., Eersels, K., Wagner, P., & Lien, T. T.** (2017). Development of an impedimetric sensor for the label-free detection of the

amino acid sarcosine with molecularly imprinted polymer receptors. *Sensors and Actuators B: Chemicals*, **246**, 461-470.

- [80] Radhakrishnan, R., Suni, I. I., Bever, C. S., & Hammock, B. D. (2014). Impedance Biosensors: Applications to Sustainability and Remaining Technical Challenges, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **2**, 1649-1655.
- [81] Shi, S., Shen, Y., Zhang, S., Zhao, Z., Hou, Z., Zhou, H., Zou, J. & Guo, Y. (2017). Combinatory evaluation of transcriptome and metabolome profiles of low temperature-induced resistant ascites syndrome in broiler chickens, *Scientific reports*, **7**(1), 2389.
- [82] Silverhydra: Vitamin-like Compounds, Choline March 7, 2011
- [83] Michel, V., Yuan, Z., Ramsuvar, S., & Bakovic, M. (2006). Choline transport for phospholipid synthesis, *Experimental biology and medicine*, **231**(5), 490-504.
- [84] Hamlin, J. C., Pauly, M., Melnyk, S., Pavliv, O., Starrett, W., Crook, T. A., & James, S. J. (2013). Dietary intake and plasma levels of choline and betaine in children with autism spectrum disorders, *Autism research and treatment*.
- [85] Sherriff, J. L., O'Sullivan, T. A., Properzi, C., Oddo, J. L., & Adams, L. A. (2016). Choline, its potential role in nonalcoholic fatty liver disease, and the case for human and bacterial genes, *Advances in nutrition*, **7**(1), 5-13.
- [86] Tan, Y., Jia, D., Lin, Z., Guo, B., He, B., Lu, C., Xiao, C., Liu, Z., Zhao, N., Bian, Z., Zhang, W., Liu, X., Lu, A. & Zhang, G. (2016). Potential metabolic biomarkers to identify interstitial lung abnormalities, *International journal of molecular sciences*, **17**(7), 1148.
- [87] Mastrokoulas, A., Pool, R., Mina, E., Hettne, K. M., van Duijn, E., van der Mast, R. C., van Ommen, G., Hoen, P. A., Prehn, C., Adamski, J. & van Roon-Mom, W. (2016). Integration of targeted metabolomics and transcriptomics identifies deregulation of phosphatidylcholine metabolism in Huntington's disease peripheral blood samples, *Metabolomics*, **12**(8), 137.
- [88] Nikzad, N., & Karami, Z. (2018). Label-free colorimetric sensor for sensitive detection of choline based on DNAzyme-choline oxidase coupling, *International Journal of Biological Macromolecules*, **115**, 1241-1248.
- [89] Arlauckas, S. P., Popov, A. V., & Delikatny, E. J. (2016). Choline kinase alpha—putting the ChoK-hold on tumor metabolism. *Progress in lipid research*, **63**, 28-40.
- [90] Tian, H., Zheng, N., Wang, W., Cheng, J., Li, S., Zhang, Y., & Wang, J. (2016). Integrated metabolomics study of the milk of heat-stressed lactating dairy cows, *Scientific reports*, **6**, 24208.
- [91] Yue, D., Jia, Y., Yao, Y., Sun, J., & Jing, Y. (2012). Structure and electrochemical behavior of ionic liquid analogue based on choline chloride and urea. *Electrochimica Acta*, **65**, 30-36.
- [92] Barkhimer, T. V., Kirchoff, J. R., Hudson, R. A., Messer Jr, W. S., & Tillekeratne, L. V. (2008). Electrochemical detection of acetylcholine and choline: application to the quantitative nonradiochemical evaluation of choline transport. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**(4), 651.
- [93] Url-2 <<http://w3.balikesir.edu.tr/~ay/lectures/ot/yuzey.puruzlulugu.pdf>>, erişim tarihi 02.04.2019.
- [94] Harris, D. C. (2003). Quantitative Chemical Analysis. Harris DC., *Calibration methods* (6. Baskı, s. 80-98). New York: WH Freeman and Company.

- [95] Yue, D., Jia, Y., Yao, Y., Sun, J., & Jing, Y. (2012). Structure and electrochemical behavior of ionic liquid analogue based on choline chloride and urea. *Electrochimica Acta*, **65**, 30-36.
- [96] Gomori, G. (1946) Buffers in the Range of pH 6.5 to 9.6. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **62**(1), 33-34.
- [97] Bates, R. G., & Robinson, R. A. Tris (hydroxymethyl) aminomethane. Useful secondary pH standard. *Analytical Chemistry*, **45**(2), 420-420.
- [98] Desmarais, W. T., Bienvenue, D. L., Bzymek, K. P., Holz, R. C., Petsko, G. A., & Ringe, D. (2002). The 1.20 Å resolution crystal structure of the aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* complexed with tris: a tale of buffer inhibition. *Structure*, **10**(8), 1063-1072.
- [99] Zeisel, S. H., Da Costa, K. A., Franklin, P. D., Alexander, E. A., Lamont, J. T., Sheard, N. F., & Beiser, A. L. E. X. A. (1991). Choline, an essential nutrient for humans, *The FASEB journal*, **5**(7), 2093-2098.
- [100] Murray, J. J., Dinh, T. T., Truett, A. P., & Kennerly, D. A. (1990). Isolation and enzymic assay of choline and phosphocholine present in cell extracts with picomole sensitivity, *Biochemical Journal*, **270**(1), 63-68.
- [101] Yao, D., Vlessidis, A. G., & Evmiridis, N. P. (2002). Development of an interference-free chemiluminescence method for monitoring acetylcholine and choline based on immobilized enzymes, *Analytica Chimica Acta*, **462**(2), 199-208.
- [102] Wise, D. D., Barkhimer, T. V., Brault, P. A., Kirchoff, J. R., Messer Jr, W. S., & Hudson, R. A. (2002). Internal standard method for the measurement of choline and acetylcholine by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Journal of Chromatography B*, **775**(1), 49-56.
- [103] Koc, H., Mar, M. H., Ranasinghe, A., Swenberg, J. A., & Zeisel, S. H. (2002). Quantitation of choline and its metabolites in tissues and foods by liquid chromatography/electrospray ionization-isotope dilution mass spectrometry, *Analytical chemistry*, **74**(18), 4734-4740.
- [104] Kehr, J., Dechent, P., Kato, T., & Ögren, S. O. (1998). Simultaneous determination of acetylcholine, choline and physostigmine in microdialysis samples from rat hippocampus by microbore liquid chromatography/electrochemistry on peroxidase redox polymer coated electrodes, *Journal of neuroscience methods*, **83**(2), 143-150.
- [105] Guerrieri, A., & Palmisano, F. (2001). An acetylcholinesterase/choline oxidase-based amperometric biosensor as a liquid chromatography detector for acetylcholine and choline determination in brain tissue homogenates, *Analytical chemistry*, **73**(13), 2875-2882.
- [106] Liberato, D. J., Yergey, A. L., & Weintraub, S. T. (1986). Separation and quantification of choline and acetylcholine by thermospray liquid chromatography/mass spectrometry, *Biomedical & environmental mass spectrometry*, **13**(4), 171-174.
- [107] Ishimaru, H., Ikarashi, Y., & Maruyama, Y. (1993). Use of high-performance liquid chromatography continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometry for simultaneous determination of choline and acetylcholine in rodent brain regions, *Biological Mass Spectrometry*, **22**(12), 681-686.
- [108] Acevedo, L. D., Xu, Y., Zhang, X., Pearce, R. J., & Yergey, A. (1996). Quantification of Acetylcholine in Cell Culture Systems by Semi-micro High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Journal of mass spectrometry*, **31**(12), 1399-1402.

- [109] Dunphy, R., & Burinsky, D. J. (2003). Detection of choline and acetylcholine in a pharmaceutical preparation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **31**(5), 905-915.
- [110] Barkhimer, T. V., Kirchoff, J. R., Hudson, R. A., Messer Jr, W. S., & Tillekeratne, L. V. (2008). Electrochemical detection of acetylcholine and choline: application to the quantitative nonradiochemical evaluation of choline transport, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**(4), 651
- [111] Burmeister, J. J., Pomerleau, F., Huettl, P., Gash, C. R., Werner, C. E., Bruno, J. P., & Gerhardt, G. A. (2008). Ceramic-based multisite microelectrode arrays for simultaneous measures of choline and acetylcholine in CNS, *Biosensors and bioelectronics*, **23**(9), 1382-1389.
- [112] Zhang, L., Yin, S., Hou, J., Zhang, W., Huang, H., Li, Y., & Yu, C. (2019). Detection of choline and hydrogen peroxide in infant formula milk powder with near infrared upconverting luminescent nanoparticles, *Food chemistry*, **270**, 415-419.
- [113] Jin, J., Muroga, M., Takahashi, F., & Nakamura, T. (2010). Enzymatic flow injection method for rapid determination of choline in urine with electrochemiluminescence detection, *Bioelectrochemistry*, **79**(1), 147-151.
- [114] Ren, X., Tang, F., Liao, R., & Zhang, L. (2009). Using gold nanorods to enhance the current response of a choline biosensor, *Electrochimica Acta*, **54**(28), 7248-7253.
- [115] Çevik, S., Timur, S., & Anik, Ü. (2012). Biocenti-voltammetric biosensor for acetylcholine and choline, *Microchimica Acta*, **179**(3-4), 299-305.
- [116] Yang, M., Yang, Y., Yang, Y., Shen, G., & Yu, R. (2005). Microbiosensor for acetylcholine and choline based on electropolymerization/sol-gel derived composite membrane, *Analytica Chimica Acta*, **530**(2), 205-211.
- [117] Campanella, L., Bonanni, A., Magri, A. L., Sorbo, A., & Tomassetti, M. (2004). Determination of choline containing phospholipids in serum, bile and amniotic fluids by the derivative enzymatic-spectrophotometric method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35**(2), 399-407.

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad : Melahat Sevgül BAKAY

Doğum Tarihi ve Yeri : 1 Ocak 1991 / Antalya

E-posta : sevgul.bakay@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2016, YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği
- **Lisans** : 2017, YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, Mühendislik Fakültesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği
- **Yüksek Lisans** : 2019, İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ, Elektronik ve Haberleşme Mühendisliği, Biyomedikal Mühendisliği

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Şubat 2018-Devam Ediyor, Araştırma Görevlisi, Düzce Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü
- Ekim 2017-Şubat 2018, Araştırma Görevlisi, İstanbul Esenyurt Üniversitesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği

DiĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- F.Ş. Utku, O.E. Ozdemir, M.S. Bakay, A Molecularly Imprinted Polymer Based Biosensor for Electrochemical Impedance Spectroscopic Analysis, *Electrica*, 18(1):39-44, 2018.
- F.Ş. Utku, O. E. Özdemir, M. S. Bakay, Empedans Spektroskopisi Analizi için MIP Tabanlı Biyosensör Geliştirilmesi, TıpTekno'16, Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi, 27-29 Ekim, 2016, Antalya.