

**VERATRİL ALKOL VERATRİL ALDEHİT ÇİFTİNİN
VOLTAMETRİK DAVRANIŞININ
VE YAN YANA ANALİZLENEBİLİRLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Adem SARIHAN



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VERATRİL ALKOL VERATRİL ALDEHİT ÇİFTİNİN
VOLTAMETRİK DAVRANIŞININ
VE YAN YANA ANALİZLENEBİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Adem SARIHAN

Doc. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2010

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Adem SARIHAN tarafından hazırlanan “Veratril alkol veratril aldehit çiftinin Voltametik davranışının ve yan yana analizlenebilirliğinin incelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR

Başkan : İmza

Üye : İmza

Üye : İmza

Üye: : İmza

Üye : İmza

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Cengiz ELMACI

Enstitü Müdürü

.../.../.....(Tarih)

U.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

.../.../.....

imza

Adem SARIHAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

VERATRİL ALKOL VERATRİL ALDEHİT ÇİFTİNİN VOLTAMETRİK DAVRANIŞININ VE YAN YANA ANALİZLENEBİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

Adem SARIHAN

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR

Bu çalışmada, lignin maddesinin, lignin peroksidaz enzimi katalizörlüğünde parçalanma reaksiyonu sırasında elektron taşıyıcı olarak görev alan, 3,4-dimetoksi benzil alkol (veratril alkol) ve 3,4-dimetoksi benzaldehit (veratril aldehit) çiftinin voltametik yöntemlerle yan yana analizlenebilirliği incelenmiş ve bu analiz koşullarının optimizasyonu için sistematik bir inceleme gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında, platin elektrot, camı karbon elektrot, grafit elektrot ve civa damla elektrodu ile çeşitli voltametik yöntemler kullanılarak analizler yapıldı. Farklı pH aralıklarındaki çeşitli tampon çözeltiler denendi. Veratril alkol ve veratril aldehit için; çalışma çözeltisi, çözelti pH si, çalışma elektrodu ve voltametik yöntem optimizasyonları gerçekleştirildi.

Ayrıca her iki bileşiğin UV-VIS spektrumları ve bileşiklerin spektrum üzerine etkileri incelendi. Spektroskopik ve voltametik tekniklerle elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

Veratril alkol ve veratril aldehit için, optimizasyonu yapılan çalışma koşullarında kalibrasyon grafikleri elde edildi. 10^{-5} M konsantrasyonlara kadar veratril alkol ve veratril aldehit için yüksek tekrarlanırlıkla tayin edilebilir oldukları gösterildi.

Anahtar kelimeler: *Veratril alkol, veratril aldehit, lignin, lignin peroksidaz.*

2010, xi + 92 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF VOLTAMMETRIC BEHAVIOUR AND ANALYSIS OF VERATRYL ALCOHOL-VERATRYL ALDEHYDE COUPLE

Adem SARIHAN

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR

In this study, analysis of the couple of VA and VAD which works as mediator during the degradation reaction of lignin by lignin peroxidase enzyme, was investigated and a systematic study was executed for the optimization of analysis conditions.

Within the study, analysis were made by using platine, graphite, glassy carbon, mercury electrode and different voltammetric techniques. In the application various buffer solutions which have different pH values were tested.

At that study, for VA and VAD, the optimization of application solution, solution pH, applicaton electrode and voltammetric method optimization were performed.

In addition, UV-VIS spectrum of VA-VAD and effect of each molecules on spectrums were examined. The results which obtained by spectroscopic method and voltammetric methods were compared.

Calibration curves were plotted at the optimized conditions for VA and VAD. It was demonstrated that, VA and VAD can analyze until 10^{-5} M concentration level with high repetition.

Key words: *Veratryl alcohol, veratryl aldehyde, lignin, lignin peroxidase.*

2010, xi + 92 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince ilgisi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan beni yönlendiren bilgi, anlayıő ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Haluk TÜRKDEMİR' e

Fen Edebiyat Fakűltesi Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Necati BEŐİRLİ'ye

Tez çalıőmam boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen, değerli hocam, Bilecik Üniversitesi Kimya bölüm başkanı, Doç. Dr. Erdal EREN' e,

Tez çalıőmam sűresince yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşım Őener ŐENOL' a, iő arkadaşım Arő. Gör. Hüseyin GÜMÜŐ' e ve maddi manevi destekleri ile sürekli yanımda olan değerli arkadaşım Murat CANAVAR' a,

Bugüne kadar, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili Aileme ve Niőanlıma sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Adem SARIHAN

.../.../.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1 Elektroanalitik Yöntemler.....	3
2.1.1. Voltametri yöntemi	6
2.1.1.1. Doğrusal taramalı voltametri	8
2.1.1.2. Çevrimsel voltametri	9
2.1.2. Puls teknikleri	10
2.1.2.1. Normal puls voltametrisi	11
2.1.2.2. Diferansiyel puls voltametrisi	12
2.1.2.3. Kare dalga voltametrisi	12
2.1.3. Polarografi	14
2.1.4. Sıyırma voltametrisi	14
2.1.4.1. Anodik sıyırma voltametrisi	15
2.1.4.2. Katodik sıyırma voltametrisi	15
2.1.4.3. Adsorptif sıyırma voltametrisi	16
2.1.4.4. Potansiyometrik sıyırma voltametrisi	16
2.2. Biyosensörler ve Enzim Biyosensörleri	17
2.3. UV-VIS Spektroskopisi ve Uygulamaları	19
2.4. Lignin	23
2.4.1. Ligninin yapısı	23
2.4.2. Ligninin önemi	25
2.4.3. Ligninin parçalanması	26
2.5. Veratril Alkol ve Veratril Aldehit	28
2.6. Veratril Alkol ve Veratril Aldehit Hakkında Literatürde Yer Alan çalışmalar	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM	33
3.1. Kullanılan Cihazlar	33
3.1.1. Potansiyostat ve elektrokimyasal sistem	33
3.1.2. UV-VIS Spektrofotometre	33
3.1.3. Diğer alet ve cihazlar	34

3.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar	34
3.1.5. Çalışmada kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları	35
3.2. Kullanılan Teknikler.....	36
4. BULGULAR	37
4.1. Voltametrik Çalışmalar	37
4.1.1. H ₂ O ₂ ile ilgili çalışmalar	37
4.1.1.1. H ₂ O ₂ için PtE ile yapılan çalışmalar	38
4.1.1.2. H ₂ O ₂ için GE ile yapılan çalışmalar.....	41
4.1.1.3. H ₂ O ₂ için GCE ile yapılan çalışmalar	42
4.1.2. VA ile ilgili çalışmalar	44
4.1.2.1. VA için GE ile yapılan çalışmalar	44
4.1.2.2. VA için PtE ile yapılan çalışmalar	45
4.1.2.3. VA için GCE ile yapılan çalışmalar	54
4.1.2.4. VA için kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması	61
4.1.3. VAD ile yapılan çalışmalar	63
4.1.3.1. VA için PtE ile yapılan çalışmalar	63
4.1.3.2. VA için GCE ile yapılan çalışmalar	67
4.1.3.3. VAD için pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde hazırlanan kalibrasyon grafikleri	70
4.1.3.4. VAD için bazik pH lerde yapılan çalışmalar	73
4.1.3.5. VAD için pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde hazırlanan kalibrasyon grafikleri	74
4.1.3.6. VAD için civa damla elektrot (CDE) ile yapılan çalışmalar	76
4.2. UV-VIS Spektroskopik çalışmalar	79
4.2.1. VAD ile ilgili spektroskopik çalışmalar	79
4.2.2. VA ile ilgili spektroskopik çalışmalar	80
4.2.3. VAD için pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde spektroskopik yöntemle hazırlanan kalibrasyon grafiği	82
4.2.4. Voltametrik ve spektroskopik yöntemlerin birlikte kullanımı ile VA' ün yükseltgenme ürününün VAD olduğunun gösterilmesi	84
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	85
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	92

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
AdSV	Adsorptif Sıyırma Voltametrisi
ASV	Anodik Sıyırma Voltametrisi
CDE	Civa Damla Elektrot
CSV	Katodik Sıyırma Voltametrisi
CV	Çevrimsel Voltametri
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
GCE	Camsı Karbon Elektrot
GE	Grafit Elektrot
HMDE	Askıda Civa Damla Elektrot
LiP	Lignin Peroksidaz Enzimi
LSV	Doğrusal Taramalı Voltametri
MnP	Mangan Peroksidaz enzimi
NPV	Normal Puls Voltametrisi
PSV	Potansiyometrik Sıyırma Voltametrisi
PtE	Platin Elektrot
SWV	Kare Dalga Voltametrisi
UV-VIS	Ultraviyole Görünür Bölge
VA	Veratril Alkol
VAD	Veratril Aldehit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	sayfa
Şekil 2.1. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması	3
Şekil 2.2. Voltametri de kullanılan bir hücrenin şematik gösterimi	6
Şekil 2.3. Voltamogram çizerken benimsenmiş olan akım-potansiyel yönleri ve kabul edilen işaretler.....	7
Şekil 2.4. LSV de zamana karşı potansiyel değişimi ve bu potansiyel değişim hızı ile pik akımı değişimi.	9
Şekil 2.5. CV de uygulanan potansiyelin zamana karşı değişimi	9
Şekil 2.6. Örnek bir çevrimsel voltamogram	10
Şekil 2.7. NPV yönteminde uygulanan potansiyel programı	11
Şekil 2.8. DPV yönteminde uygulanan potansiyel programı	12
Şekil 2.9. SWV yönteminde uygulanan potansiyel programı	13
Şekil 2.10. SWV yönteminde ortaya çıkan akım büyüklükleri	13
Şekil 2.11. Biyosensörlerin şematik gösterimi	17
Şekil 2.12. Biyosensörlerin genel olarak çalışma prensibi	18
Şekil 2.13. UV-VIS bölge spektrofotometresinin şekli	21
Şekil 2.14. Koniferil, sinapil ve kumaril alkollerin yapısı	23
Şekil 2.15. 1977’de Adler tarafından benimsenmiş lignin model yapısı	24
Şekil 2.16. LiP enzimi etkisi ile ligninin parçalanma döngüsü	27
Şekil 2.17. Veratril alkol ve veratril alkolün moleküler yapısı ve lignin peroksidaz enzimi (LiP) ile birbirine dönüşmesi	28
Şekil 2.18. Lignin peroksidaz enzimi etkisi ile veratril alkolün yükseltgenmesi	29
Şekil 2.19. Veratril alkol radikalinden veratril aldehitin meydana gelmesi	29
Şekil 2.20. Ligninin, LiP katalizörlüğünde parçalanmasında VA ün mediatörlüğü.	30
Şekil 4.1. pH 3,5 asetat tamponu içerisinde, PtE ile 2 mM H ₂ O ₂ çözeltisinde çözülmüş oksijen gideriminin LSV üzerine	38
Şekil 4.2. Çeşitli pH lerde ve farklı bileşimli tampon çözeltiler içerisinde, PtE ile 2 mM H ₂ O ₂ çözeltisi için elde edilen katodik yöndeki LSV ler	39
Şekil 4.3. Çeşitli pH lerde ve farklı bileşimli tampon çözeltiler içerisinde, PtE ile 2 mM H ₂ O ₂ çözeltisi için elde edilen anodik yöndeki LSV ler	40

Şekil 4.4. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, 2 mM H ₂ O ₂ için, PtE ile elde edilen CV ler	41
Şekil 4.5. GE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde H ₂ O ₂ ye ait CV ler	42
Şekil 4.6. GCE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde H ₂ O ₂ ye ait CV ler	43
Şekil 4.7. GE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde VA ya ait CV ler	45
Şekil 4.8. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde platin elektrot ile VA' e ait CV ler ...	46
Şekil 4.9. PtE ile farklı pH deki tartarat tamponları içinde VA e ait CV ler.....	47
Şekil 4.10. Pt elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde VA' e ait CV ler	48
Şekil 4.11. Pt elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda VA çözeltilerine ait CV ler	49
Şekil 4.12. PtE ile VA piki için, tartarat ve Britton-Robinson tamponlarının karşılaştırılması	50
Şekil 4.13. PtE un analiz öncesi çeşitli potansiyelerde bekletilmesinin etkisi	51
Şekil 4.14. Pt elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, puls periyodu konsantrasyonunun DPV ler üzerindeki etkisi	52
Şekil 4.15. Pt elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde DPV ve CV ile elde edilen piklerin karşılaştırılması	53
Şekil 4.16. Pt elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde SWV, DPV ve CV ile elde edilen piklerin karşılaştırılması	53
Şekil 4.17. Camsı karbon elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde VA' e ait CV	54
Şekil 4.18. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde GCE ve Pt ile elde edilen CV ler ...	55
Şekil 4.19. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, 2 mM VA için, GCE ile DPV yöntemi ile puls periyodu değişiminin etkisi	56
Şekil 4.20. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile SWV, DPV ve CV nin karşılaştırılması	57
Şekil 4.21. GCE ile SWV yöntemi kullanılarak bazik pH lerdeki tamponların karşılaştırılması	58
Şekil 4.22. GCE ile SWV yöntemi kullanılarak farklı pH lerdeki tamponları karşılaştırılması	59
Şekil 4.23. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE elektrot ile girişim incelemesi	61
Şekil 4.24. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile VAD etkisi ile VA pikindeki azalma	61

Şekil 4.25. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile tampon etkisi ile VA pikiindeki azalma	61
Şekil 4.26. VA yüksek konsantrasyonlar için kalibrasyon grafiği	62
Şekil 4.27. VA düşük konsantrasyonlar için kalibrasyon grafiği	62
Şekil 4.28. VA için, optimizasyonu yapılan şartlarda elde edilen konsantrasyon-akım eğrileri	62
Şekil 4.29. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, Pt elektrot ile VAD için elde edilen CV ler	64
Şekil 4.30. PtE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, VA piki üzerine VAD etkisi	64
Şekil 4.31. PtE ile DPV tekniği kullanılarak VA yükseltgenme piki üzerine VAD etkisi	65
Şekil 4.32. PtE ile DPV tekniği kullanılarak VA indirgenme piki üzerine VAD etkisi	66
Şekil 4.33. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile VAD incelemesi	67
Şekil 4.34. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile VAD' e ait farklı pus periyotlarındaki DPV ler	68
Şekil 4.35. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile VAD piki için DPV ve SWV yöntemlerinin karşılaştırılması	69
Şekil 4.36. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE elektrot ile SWV yöntemi kullanılarak VAD piki üzerine girişim etkisi	70
Şekil 4.37. VAD için, yüksek konsantrasyonlarda pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, elde edilen kalibrasyon grafiği	72
Şekil 4.38. VAD için, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, düşük konsantrasyonlarda elde edilen kalibrasyon grafiği	72
Şekil 4.39. VAD için, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile SWV yöntemi kullanılarak, elde edilen konsantrasyon-akım eğrileri	72
Şekil 4.40. GCE ile SWV yöntemi kullanılarak VAD piki üzerine çözelti pH sinin etkisi	73
Şekil 4.41. VAD için, pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde yüksek elde edilen kalibrasyon grafiği	75
Şekil 4.42. VAD için, pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde, düşük konsantrasyonlar için elde edilen kalibrasyon grafiği	75
Şekil 4.43. VAD için, pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde, GCE ile SWV yöntemi kullanılarak, elde edilen konsantrasyon-akım eğrileri ...	75

Şekil 4.44. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde CDE ile VAD piki için SWV ve DPV yöntemlerinin karşılaştırılması	76
Şekil 4.45. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, civa damla elektrot ile VAD piki üzerine girişim etkileri	77
Şekil 4.46. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde GCE ile 0,1 mM VAD' e ait pik	78
Şekil 4.47. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde CDE ile 0,1 mM VAD' e ait pik	78
Şekil 4.48. 1×10^{-5} M VAD ait UV-VİS bölgede elde edilen spektrum	79
Şekil 4.49. VAD spektrumu üzerine VA' ün etkisi	80
Şekil 4.50. 1×10^{-5} M VA ait UV-VİS bölgede elde edilen spektrum	81
Şekil 4.51. VA spektrumu üzerine VAD' in etkisi	81
Şekil 4.52. pH 3,5 tartarat içerisinde, farklı konsantrasyondaki VAD çözeltilerine ait spektrumlar	83
Şekil 4.53. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, spektroskopik yöntemlerle, 10^{-5} M konsantrasyonlar için elde edilen kalibrasyon grafiği	83
Şekil 4.54. 1×10^{-5} VA içeren çözeltiliye 1200 mV potansiyel uygulaması yapılmadan ve yapıldıktan sonra elde edilen spektrumlar	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

	sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar	34
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan tampon çözeltiler ve kullanıldığı pH aralıkları	35
Çizelge 4.1. Veratril alkole ait düşük ve yüksek konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler için elde edilen akım büyüklükleri	62
Çizelge 4.2. Veratril aldehite ait düşük ve yüksek konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler için elde edilen akım büyüklükleri.....	71
Çizelge 4.3. Veratril aldehite ait pH 9,0 da düşük ve yüksek konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler için elde edilen akım büyüklükleri.....	74

1. GİRİŞ

Selüloz, kâğıt ve biyoyakıt fabrikaları başta olmak üzere çeşitli endüstriyel süreçler sonucu oluşan atık sularda çeşitli fenolik bileşikler ve lignin bulunmaktadır. Çevre kirliliği açısından büyük önem taşıyan bu bileşiklerin nicel olarak rutin yöntemlerle analiz edilebilmesi önem taşımaktadır.

Ligninin yapısı çok karmaşık olduğu ve tam olarak belli bir yapısı olmadığından, lignin analizi ve biyolojik yıkım süreci ile ilgili çalışmalarda ligninin kendisinden yararlanmak mümkün değildir. Bu amaçlarla ligninin parçalanma süreçlerine katılan diğer yardımcı bileşiklerden yararlanmak gereklidir.

Lignin ve türevlerinin biyolojik yıkıma uğratılması sırasında veratril alkol adı verilen bir madde ortaya çıkmaktadır. $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{OH}$ yapısındaki ve açık adı 3,4-dimetoksi benzil alkol olan veratril alkol, ligninin biyolojik olarak parçalanmasını katalizleyen lignin peroksidaz (ligninaz, LiP) enziminin lignini parçalama mekanizmasında mediatör (elektron taşıyıcı) görevi görür. Lignin için model bir bileşik olan Veratril alkol (VA); ligninin parçalamasına ait enzimatik süreçte elektron kaybederek veratril aldehite yükseltgenir. Bu nedenle, lignin miktarı ile ilgili çalışmalarda veratril alkol miktarındaki azalma veya veratril aldehitin miktarındaki artıştan yararlanılabilir. Ligninin biyolojik yıkım sürecinin incelenmesinde olduğu kadar, LiP enziminin aktivitesinin ölçüldüğü biyokimyasal süreçlerde de veratril alkolün veya veratril aldehitin miktarının incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

Lignin ile ilgili endüstriyel süreçlerin incelenmesinde ve/veya enzim aktivitelerinin ölçülmesi çalışmalarında, veratril alkolün yükseltgenme ürünü olan veratril aldehitin 310 nm dalga boyunda yaptığı soğurumdan yararlanılmak üzere spektroskopik yöntemler kullanılır. Ancak, lignin ve türevlerinin substrat olarak yer aldığı bu enzimatik ortamlarda moleküler soğurum yapabilen çok sayıda bileşiğin var olması ve ligninin parçalanma ortamlarının türbidimetrik etkisi nedeniyle, spektroskopik tekniklerle ölçümün hassaslığı az, tekrarlanırlığı düşük ve bu çalışma ortamlarında spektroskopik tekniklerin geliştirilmesi ve uygulaması zordur.

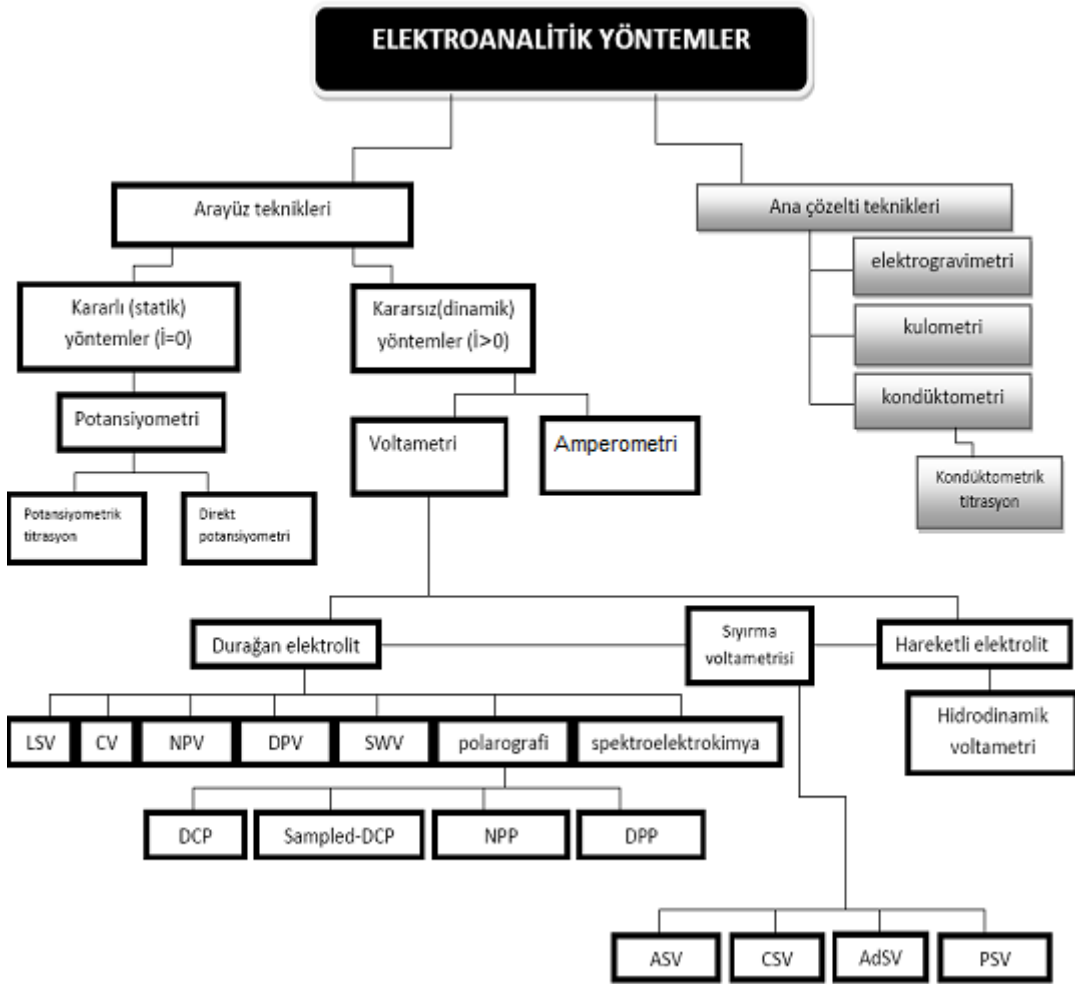
Çalışılan ortamın berrak olmamasından olumsuz etkilenmeyen voltametrik yöntemler önemli bir seçenek oluşturmaktadır. Geliştirilecek tekniklerin rutin takiplerde kullanılabilen biyosensör geliştirilmesi çalışmalarının önünü açması açısından üzerinde durulması yararlı olacaktır.

Çalışmada; lignin ile ilgili süreçlerin incelenmesinde, spektroskopik yöntemlerle yapılmakta olan veratril alkol veratril aldehit analizine alternatif bir voltametrik analiz yöntemi geliştirilmeye çalışıldı. Bu voltametrik yöntem için çeşitli optimizasyonlar yapıp kalibrasyon grafikleri hazırlandı. Spektroskopik yöntemlerle de, veratril aldehitin 310 nm dalga boyunda yaptığı soğurumdan yararlanılarak analizler yapıp kalibrasyon grafikleri hazırlandı. Voltametrik ve spektroskopik yöntemlerle elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik kimya, maddelerin elektrokimyasal özelliklerinin, kalitatif ve kantitatif analiz amaçlı kullanılması ile ilgilenen bilim dalıdır. Elektroanalitik kimyada kullanılan yöntemler, yöntemin uygulanma biçimine, yöntemde kullanılan elektrokimyasal hücrenin ve hücre bileşenlerinin türüne, çözelti türüne göre çeşitli sınıflara ayrılırlar. Genel bir sınıflandırma aşağıda gösterilmiştir (Türkdemir 2008).



Şekil 2.1. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması (Türkdemir 2008)

Elektroanalitik yöntemler genel olarak, *Ana çözelti* ve *Arayüz* teknikleri olmak üzere ikiye ayrılır

Ana çözelti tekniklerinden elektrogravimetri ve kulometride, çözeltideki analizlenecek türün veya türlerin tamamı çalışma elektrodu üzerinde tepkime verinceye kadar akım geçişi sürdürülür. Bu tekniklerde elde edilen sinyalle madde miktarı yada konsantrasyon arasında doğrusal ilişki aranmasına gerek duyulmaz, tepkime sonucunda tartım alınarak veya Faraday elektroliz yasaları gibi çeşitli eşitliklerden faydalanılarak doğrudan madde miktarı veya konsantrasyona geçilebilir. Her iki teknik de, sabit akım veya potansiyel kontrollü koşullarda uygulanabilmektedir. Kondüktometri ise ölçüm ortamındaki toplam iyonik türlerin neden olduğu elektrolitik iletkenlik veya bu iletkenliğin değişiminin ölçümüne dayalı olup, analitik amaçlarla daha çok kondüktometrik titrasyondan yararlanır.

Arayüz tekniklerinde ise, ana çözelti bileşiminden bağımsız olarak çözelti-elektrot arayüzeyinde, iyon veya moleküllerin hareket etmesi ile ya da yükseltgenme-indirgenme tepkimesi vermesi ile meydana gelen potansiyel veya akım büyüklüğündeki değişimden yararlanılarak konsantrasyon hakkında bilgi sahibi olunabilir.

Ara yüzeyde elektrokimyasal reaksiyon sonucunda değişime uğrayan (yükseltgenen yada indirgenen) madde miktarı çok küçük olduğundan, çözeltinin ana konsantrasyonu değişmez. Arayüz teknikleri *kararlı* ($\dot{I}=0$) ve *kararsız* ($\dot{I}>0$) yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır.

Kararlı yöntemler, ölçüm için kullanılan elektrottan akım geçmezken yani hücre dengede iken elektrot potansiyelinin veya değişiminin ölçülmesi ilkesine dayanır. Potansiyometri olarak bilinen bu yöntemde örnek çözeltisindeki analit konsantrasyonu değişmelerine karşı potansiyeli değişen bir elektrodun potansiyeli, genel bir karşılaştırma (referans) elektrot yardımıyla ölçülmektedir. En genel uygulamasıyla pH ölçümünde kullanılan bu yöntem, çok yüksek duyarlılığa sahip olmamakla birlikte, sensör hazırlama ve rutin takip gibi kolaylıkları nedeniyle çok kullanılmaktadır (Türkdemir 2008).

Kararsız yöntemlerde, elektrokimyasal hücre dengede değildir, arayüz teknikleri ile ilgili olan bu tekniklerde, elektrodun temas ettiği çözelti ile oluşturduğu durağan çift tabaka ve bu kısımdakiler etkindir. Potansiyometriye oranla çok daha yüksek duyarlılık ve uygulama çeşitliliğine sahiptir. Empedans yöntemleri dışında çoğunlukla hücreden geçen akımın büyüklüğünden faydalanılarak kantitatif analiz ve bu akımın bulunduğu potansiyelden faydalanılarak kalitatif analiz yapılabilir.

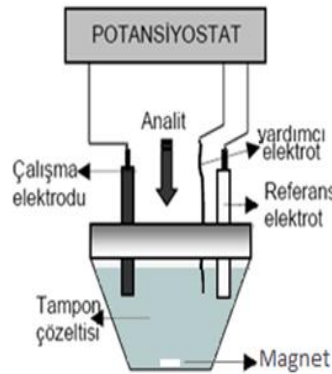
Çalışma elektrodu üzerinden geçen ve ölçülmekte olan akımın iki bileşeni vardır; uygulanan potansiyele bağlı olarak çalışma elektrodu üzerinde çift tabaka oluşumu ve yüklenmesi ile ilgili kapasitif akımlar, elektrot üzerinde redoks tepkimesi büyüklüğüne karşılık gelen faradaik akımlar. Arayüz tekniklerinin iyi anlaşılabilmesi için çift tabaka yapısının iyi anlaşılması ve akım ölçümleri içindeki kapasitif akım bileşeninin öneminin azaltılması için geliştirilen önlem ve tekniklerin doğru şekilde ele alınması için önem taşımaktadır. Çözeltiye daldırılan iletken bir çubuk üzerinde potansiyel oluşmasının iki yolu bulunmaktadır, fermi enerji düzeyleri farkına bağlı olarak ortaya çıkan elektrot potansiyeli veya dışarıdan elektroda uygulanan gerilim. Çalışma elektroduna uygulanan potansiyelden dolayı pozitif elektrik yükü ile yüklendiğinde çift tabakanın çözelti tarafı da zıt yüklü iyonlarla yüklenerek zıt yüklü iki paralel düzlemden oluşan bir kapasitör oluşumuna yol açarlar.

2.1.1. Voltametri yöntemi

Voltametri, bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden yararlanarak analit hakkında bilgi edinilebilen bir elektroanalitik yöntemdir.

Tarihsel olarak voltametri, Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1922 yılında voltametrimin özel bir tipi olan polarografiden geliştirilmiştir. Polarografi, diğer voltametri tiplerinden çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodu (DCE) kullanılması bakımından farklılık gösterir (Bockris ve ark. 1970, Yıldız ve Genç. 1993).

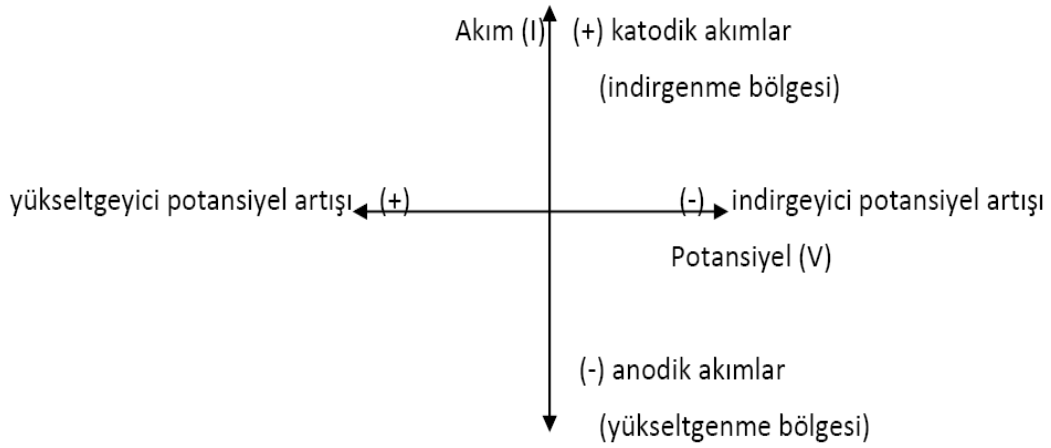
Yöntem, üç elektrotlu bir hücre içerisinde gerçekleştirilir. Bu elektrotlar, çalışma elektrodu, referans elektrot ve yardımcı elektrot olarak adlandırılır. Yöntem, referans elektrot ile çalışma elektrodu arasında belirli bir potansiyel uygulaması yapılırken, çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot arasından geçen akımın ölçülmesi ve incelenen potansiyel aralığındaki akım değişimlerinden yararlanılarak analiz yapılması temeline dayanır. Burada kullanılan çalışma elektrodunun görevi, arayüzeyde, moleküllerin yükseltgenmesi ve indirgenmesi için, elektron alıcı ve elektron kaynağı olarak görev alır. Bu elektrotlar elektrokimyasal olarak ve çalışılan çözeltiye karşı inert davranan maddeler olmalıdır. Voltametri çalışmalarında çoğunlukla platin, altın, civa gibi metal ya da grafit veya camsı karbon gibi iletken ametalik yapılar ile çeşitli amaçlara göre hazırlanmış modifiye yüzeyli elektrotlar kullanılır. Şekil 1.3'te 3 voltametik çalışmalarda kullanılan 3 elektrotlu bir çalışma hücresinin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.2. Voltametri için kullanılan bir hücrenin şematik gösterimi

Polarografide çalışma elektrodu olarak her bir akım okuması için önceden geçen akımlar nedeniyle başkalaşıma uğramamış ve oksitlenmemiş yeni bir elektrot yüzeyi sağlayan damlayan civa elektrot kullanılır. Bu elektrotların çalışma potansiyel aralıkları farklılık gösterir, ilgilenilen çalışma aralığı için hangi elektrot uygun ise o elektrot çalışma elektrodu olarak seçilir. Elektrot seçiminde elektrodun çalışma potansiyel aralığı kadar, elektron transfer reaksiyonunun hızı, kinetiği ve elektrottan beklenen seçicilik/duyarlık da önemlidir. Üç elektrotlu hücrede yer alan yardımcı elektrodun görevi üzerinden akım geçen devreyi tamamlamaktır, elektrokimyasal olarak ve çalışılan çözeltiliye karşı inert davranan, iletken bir madde olmalıdır. Bu amaçla çoğunlukla platin tel veya levha kullanılır. Referans elektrot ise, çalışma elektrodu üzerine uygulanan potansiyelin bağıl olarak ayarlanmasında temel alınan karşılaştırma elektrotlardır. Polarize olmayan referans elektrotların potansiyelleri, üzerinden akım geçse bile değişmemelidir.

Voltamogram çizerken IUPAC tarafından benimsenmiş olan akım-potansiyel yönleri ve kabul edilen işaretleri, şekil 1.3’de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Voltamogram çizerken benimsenmiş olan akım-potansiyel yönleri ve kabul edilen işaretler

Voltametri yönteminde hücredeki elektrolit *hareketli* ve *durağan* olmak üzere iki tür olabilir.

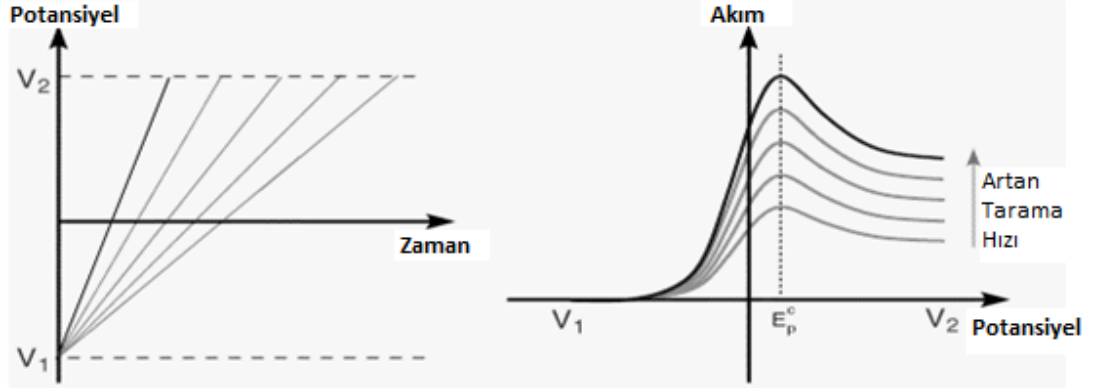
Elektrolitin hareketli olduğu en genel uygulama; sıvı kromatografide bazı çok duyarlı analizler için elektrokimyasal dedektörün kullanıldığı hidrodinamik voltametridir.

Voltametrik çalışmalarda birkaç özel uygulama dışında madde taşınmasının yalnızca difüzyonla gerçekleştiği durağan elektrolit koşullarında çalışılır. Çalışma elektrodunun farklılığına göre yapılan sınıflandırma dışında uygulanan potansiyel programının doğrusal taramalı ya da puls niteliğinde olmasına göre de çeşitlenme ortaya çıkmaktadır. Puls teknikleri ise, kapasitif akımlardan kaçınmak için geliştirilmiş normal puls (NPV), diferansiyel puls (DPV), kare dalga voltametrisi (SWV) gibi tekniklerden oluşmaktadır. Bunlardan farklı olarak spektroskopi ve voltametrinin birlikte kullanıldığı spektroelektrokimya olarak adlandırılan teknik de yine durağan elektrolit ile yapılan voltametrik çalışmalar arasında bulunmaktadır (Wang 2006).

2.1.1.1. Doğrusal taramalı voltametri

Uygulanan potansiyel programı en basit olan teknik LSV tekniğidir. Potansiyel bir başlangıç potansiyelinden (V_1), bitiş potansiyeline (V_2) kadar, sabit bit hızla doğrusal olarak değiştirilir ve değişen potansiyele karşı akım değişimleri incelenir (Anonim 5).

Uygulanan potansiyele karşı, meydana gelen akım değerlerinin grafiğe geçirilmiş haline *voltamogram* denir. Bu voltamogramın karakteristikleri, elektron transfer reaksiyonunun hızına ve uygulanan potansiyelin değişim hızına bağlıdır.

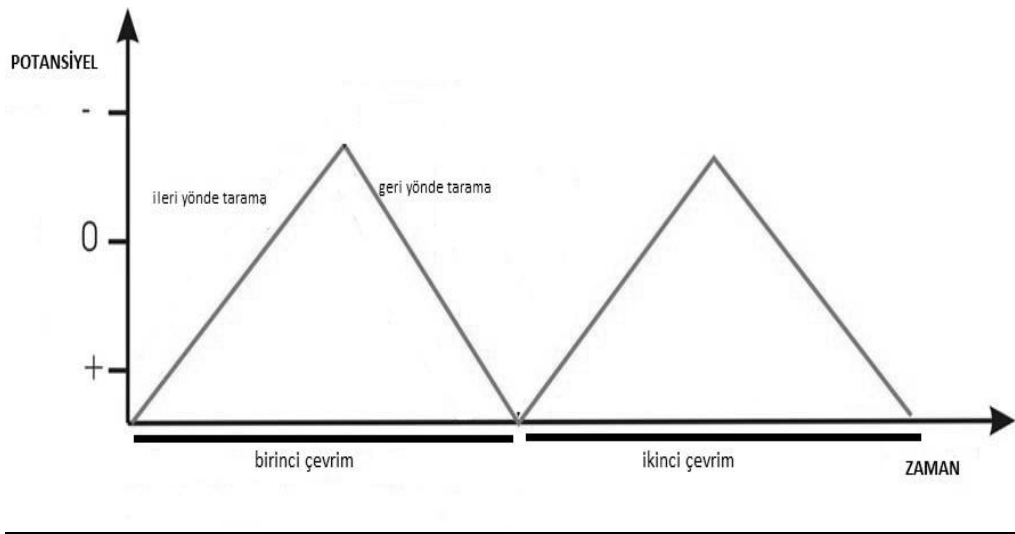


Şekil 2.4. LSV de zamana karşı potansiyel değişimi ve bu potansiyel değişim hızı ile pik akımı değişimi (Andrienko 2008)

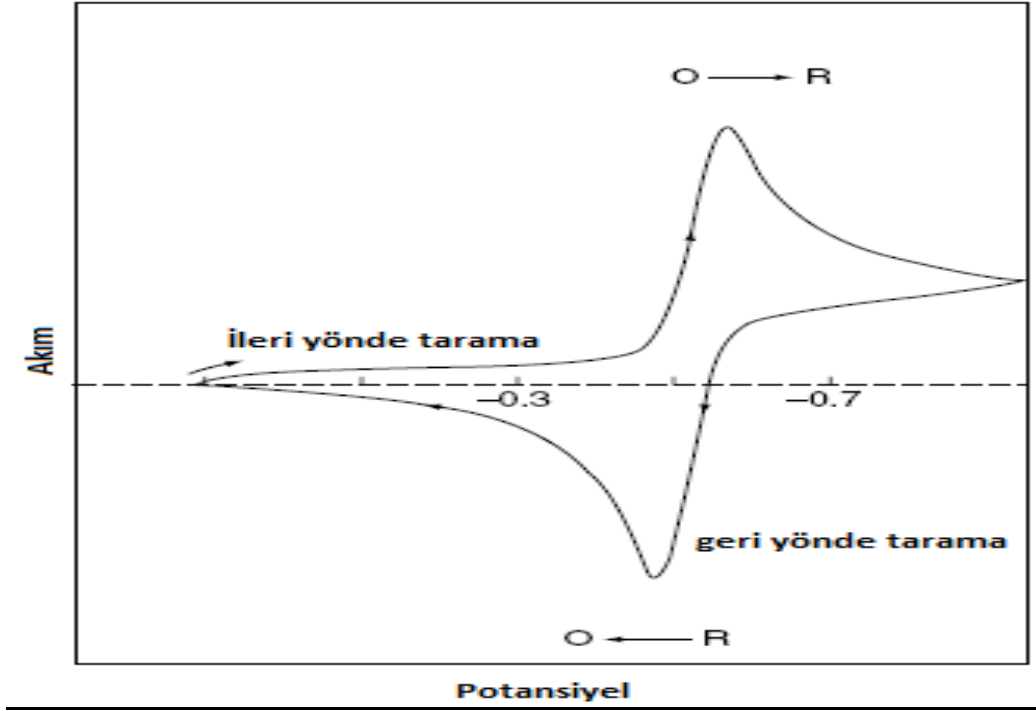
Şekil 2.4'te LSV, potansiyel tarama hızının, geçen akım büyüklüğüne etkisi gösterilmiştir (Andrienko 2008).

2.1.1.2. Çevrimsel voltametri

Çevrimsel voltametri (CV), sabit tarama hızında, potansiyel belli bir V_1 başlangıç potansiyeli değerinden başlanarak, V_2 potansiyeline kadar taranır. Ardından, ters yönde potansiyel uygulaması yapılır.



Şekil 2.5. CV de uygulanan potansiyelin zamana karşı değişimi



Şekil 2.6. Örnek bir çevrimsel voltamogram

Şekil 2.6’da, örnek bir çevrimsel voltamogram gösterilmiştir. Burada, ileri yani katodik yönde tarama yapılırken, çözelti içerisinde çalışılan potansiyel aralığında indirgenebilecek formda madde varsa, belli bir potansiyelde indirgenme gerçekleşir, geri (anodik) yönde tarama yapılırken, bu indirgenme ürünü veya çözelti içerisindeki başka bir yükseltgenebilecek madde bulunuyorsa, yeterli potansiyel büyüklüğüne erişildiğinde yükseltgenme gerçekleşir (Wang 2006).

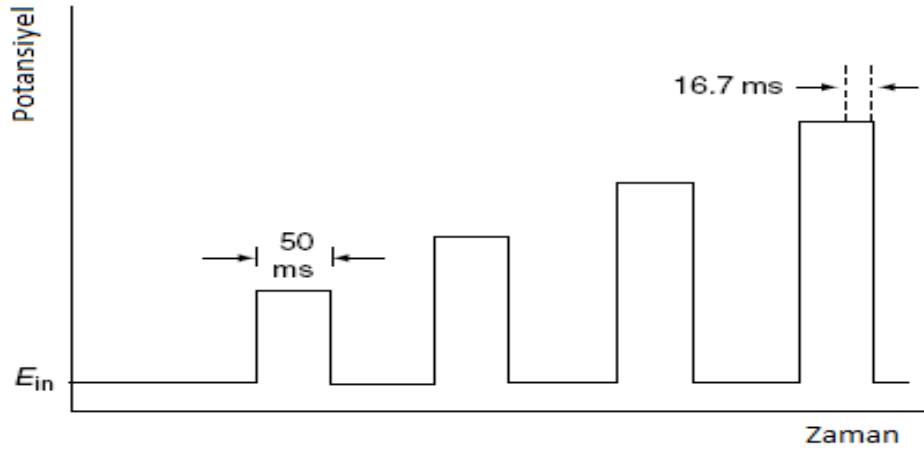
2.1.2. Puls teknikleri

Puls voltametik teknikler daha düşük tayin sınırlarında analizler yapabilmek amacı ile ortaya çıkarılmıştır. Düşük tayin sınırlarına inme, faradayik ve faradayik olmayan (kapasitif) akımların oranının yükseltilmesi temeline dayanır. Bu yöntemlerle, 10^{-8} M konsantrasyon seviyesinde analizler yapılabilir. Modern puls teknikleri gösterdiği bu yüksek performans sayesinde, analitik çalışmalarda klasik polarografinin yerini almıştır. Puls tekniklerinin temelinde, örneklendirilmiş akım potansiyel basamağı deneyi vardır. Burada, çalışma elektrodu üzerine, yaklaşık 50 ms lik sürelerde, potansiyel basamakları

dizisi uygulanır. Potansiyel basamağından sonra, yükleme akım (kapasitif akımlar) hızlı bir şekilde ihmal edilebilir bir seviyeye düşerken, faradayik akımlar, daha yavaş bir şekilde azalır. Bundan dolayı, uygulanan pulsun son zaman dilimlerinde akım okunması gerçekleştirilir, böylece okunan akım değeri içerisindeki faradayik kapasitif akım oranı artmış olur.

2.1.2.1. Normal puls voltametri

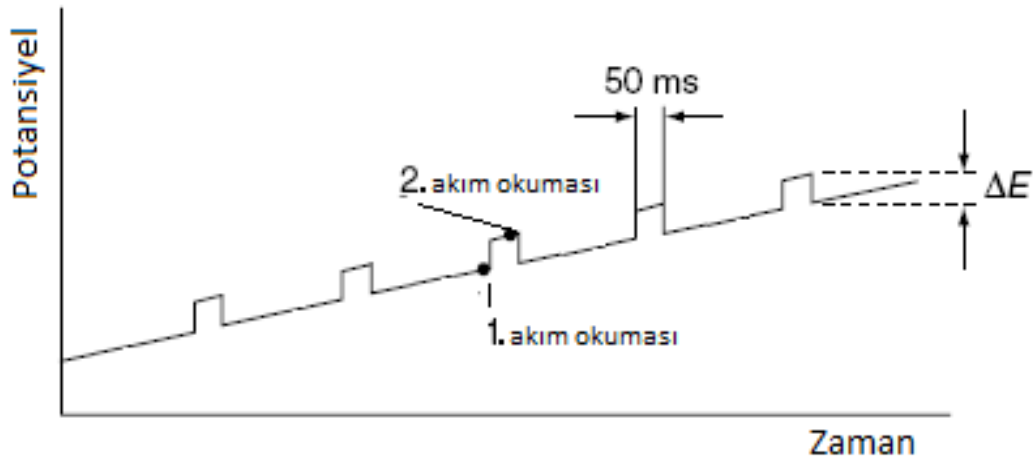
Normal puls voltametri, genliği sürekli artış gösteren bir seri potansiyel basamaklarının uygulanması şeklinde gerçekleştirilir. Her pulsun ardından potansiyel tekrar başlangıç potansiyeline düşer. Akım okuması ise, her pulsun son 16,7 ms lik kısmında yapılır. Çünkü pulsun son anlarında, toplam akım içerisinde faradayik akımların oranı artar. Burada elde edilen voltamogram bir pik şeklindedir. Puls tekniği ile LSV yi kıyasladığımızda, puls tekniklerinde potansiyel uygulama süresi kısa olduğundan dolayı, difüz katman daha incedir ve sebeple, faradayik akımlar daha yüksektir. NPV, LSV ye göre yaklaşık 5-10 kat daha yüksek duyarlık sağlayabilmektedir (Wang 2006).



Şekil 2.7. NPV yönteminde uygulanan potansiyel programı

2.1.2.2. Diferansiyel puls voltametri:

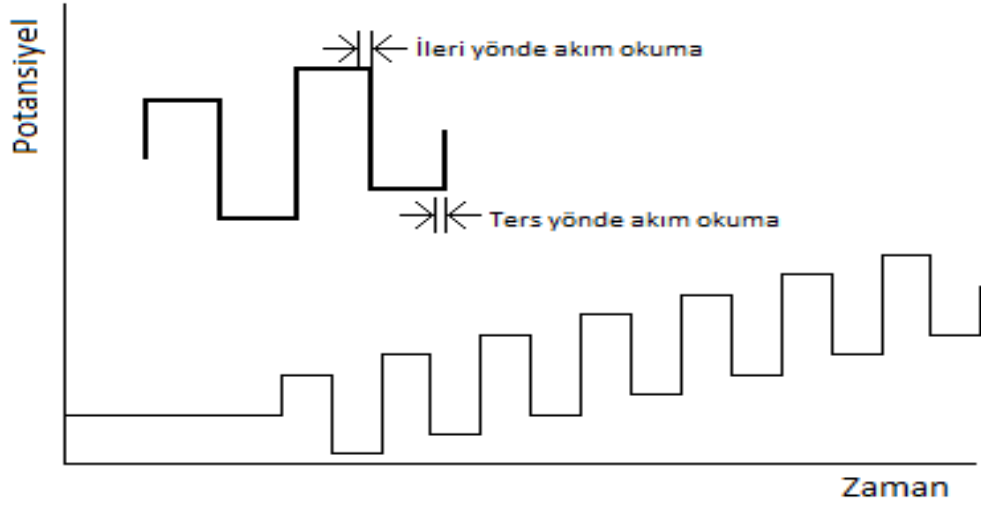
Diferansiyel puls voltametri, düşük konsantrasyondaki organik ve anorganik türlerin analizi için kullanışlı bir yöntemdir. Bu yöntemde, uygulanan puls şekli, doğrusal olarak artan bir potansiyel eğrisi üzerine, sabit genlikli bir puls potansiyel programının bindirilmesi ile elde edilmektedir. Her puls periyodunda akım iki kez okunur, birincisi, puls uygulamasının hemen öncesindeki son 16,7 ms sinde, ikincisi ise pulsün son anlarında, kapasitif akımların etkisinin en aza indiği zaman diliminde yapılır. Bu iki akım değeri arasındaki farkın uygulanan potansiyele karşı grafiğe geçirilmesi ile voltamogram elde edilir ve bu voltamogram üzerindeki piklerin akım büyüklüğü, ilgilenilen analitin konsantrasyonu ile orantılıdır (Wang 2006).



Şekil 2.8. DPV yönteminde uygulanan potansiyel programı (Wang)

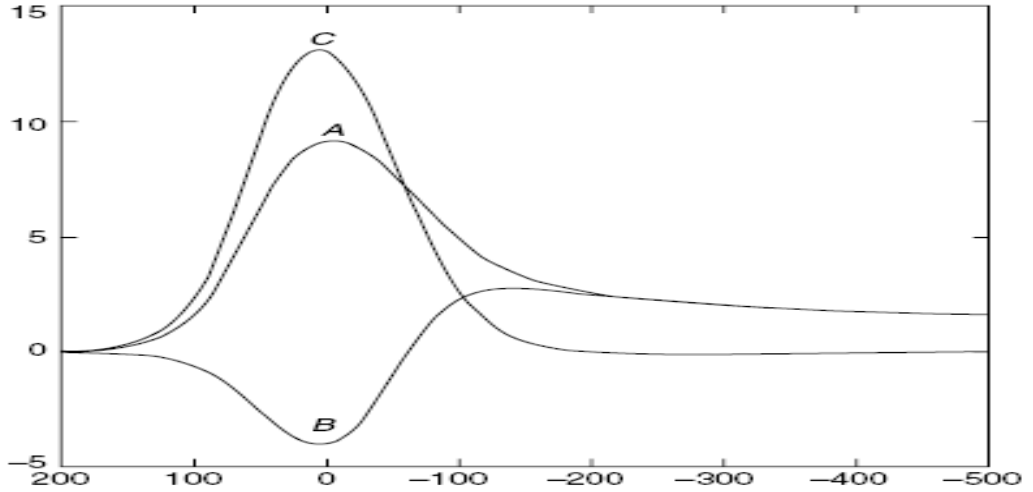
2.1.2.3. Kare dalga voltametri

Bu teknikte, çalışma elektrodu üzerine ileri yönde ve ters yönde, simetrik kare dalgalar şeklinde potansiyel uygulaması yapılır. Akım okumaları ise, kapasitif akımların toplam akım içindeki payının çok küçüldüğü ileri ve geri yöndeki kare dalgaların son zaman dilimlerinde yapılır. Kare Dalga periyodu boyunca DPV den farklı olarak potansiyel sabittir. Diğer puls tekniklerine oranla çok daha hızlı bir teknik olan SWV ile 1×10^{-8} M gibi çok düşük tayin sınırına kadar, hassalığı çok yüksek analizler yapılabilir (Wang 2006, Kounaves 1997).



Şekil 2.9. SWV yönteminde uygulanan potansiyel programı

Şekil 2.9 da, SWV yönteminde uygulanan potansiyel programı ve ileri ve geri yöndeki simetrik kare dalgalarda, akım büyüklüklerinin okunduğu kısımlar gösterilmiştir. Şekil 2.10 da ise, ileri (A) ve geri (B) yöndeki akım okumaları ile meydana gelen akım büyüklükleri ve fark akım büyüklüğünün (C) karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.10. SWV yönteminde ortaya çıkan akım büyüklükleri

- A) İleri yönde kare dalga uygulaması ile ortaya çıkan akım
- B) Geri yönde kare dalga uygulaması ile ortaya çıkan akım
- C) İleri yöndeki okuma ile oluşan akım büyüklüğünden, geri yöndeki okuma ile oluşan akım büyüklüğünün çıkarılması ile ortaya çıkan fark akım.

2.1.3. Polarografi

Polarografi yöntemi, 1922 yılında, Çekoslovakyalı bilim adamı, Heyrovsky tarafından bulunmuştur. Yöntem, çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodun kullanıldığı voltametrik bir tekniktir (Lakshminarayanan 2004). Civa elektrot üzerinde H_2 çıkış tepkimesine ilişkin aktivasyon aşırı gerilimi çok büyük olduğu için civa elektrotla katodik çalışma potansiyel aralığı çok geniştir. Bu sayede katı elektrotlarla yapılabilen çalışma aralığından da negatif potansiyellerde indirgenen analitlerin analizleri bu teknikle olanaklıdır. Bu yöntemin diğer önemli avantajı ise, sürekli yenilenen elektrot yüzeyi ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Böylece elektrot yüzeyinin değişiminden kaynaklanabilecek hatalar en aza indirilmeye çalışılır. Her yeni damlada çift tabakanın yeniden oluşması ve büyük kapasitif akımlar, ayrıca damla büyüklüğünün sabit kalmaması yöntemin olumsuzluklarıdır. Damlayan civa elektrodun geliştirilmesi, normal ve puls şeklinde potansiyel programlarının uygulanması ile bu olumsuzluklar aşılmaktadır.

2.1.4. Sıyırma voltametri

Sıyırma voltametri tekniği, elektroanalitik teknikler arasında tayin sınırı en düşük, hassaslığı ve seçiciliği en iyi olan tekniktir. Diğer elektroanalitik tekniklere göre çok daha üstün olmasının en büyük sebebi, önderiştirme yani analizlenecek türlerin elektrot üzerinde biriktirilerek zenginleştirilmesi basamağıdır. Bu zenginleştirme basamağı sayesinde tayin sınırı diğer tekniklere nazaran çok daha düşük değerlere düşebilmektedir. Sıyırma voltametri 2 basamaklı bir tekniktir. İlk basamak depozisyon basamağıdır. Burada istenen türlerin elektrot yüzeyinde toplanmasına olanak sağlarken, istenmeyen türlerin girişim yapmasını engelleyecek bir potansiyel seçilmelidir. İkinci basamak ise sıyırma basamağıdır. Burada incelenecek türler uygun bir şekilde sıyırılarak çözeltiliye geçirilir ve bu işlem sırasında ölçüm gerçekleştirilir. Bu teknikte eş zamanlı olarak, yükseltgenme veya indirgeneme potansiyeli birbirinden farklı olan birden fazla maddenin analizi yapılabilmektedir. Uygun potansiyelde analizlenecek türler elektrot yüzeyinde biriktirilir ardından uygun potansiyel taraması ile maddeler farklı

potansiyelerde sıyrılır ve her madde için uygun pikler elde edilir. Bu yöntem ile hem hareketli hem de durağan elektrolitler ile çalışılabilme imkânı vardır.

Depozisyon ve sıyırma basamaklarının uygulanma biçimini bağlı olarak sıyırma voltametri teknikleri, genel olarak dört ayrı ad altında incelenebilir.

2.1.4.1. Anodik sıyırma voltametrisi (ASV)

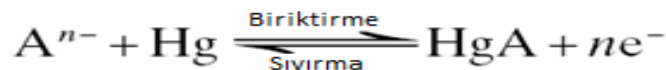
Bu teknikte biriktirme sürecinde, uygun potansiyelde civa ile amalgam oluşturabilen metal katyonları karıştırılan çözelti ortamından difüzyonun yanı sıra konveksiyonla taşınarak, civa damla elektrot (HMDE) veya ince film civa elektrot (TFME) üzerinde indirgenerek toplanır. Metal iyonları indirgenerek birikecekleri bu civa yüzeylerine difüzyon ve konveksiyon hareketleri ile ulaşırlar. Bu iletim hareketleri, çözeltinin ya da elektrodun döndürülmesi ile artırılabilir.



Depozisyon işleminden sonra, lineer bir şekilde anodik potansiyel değişim programı uygulanır, civa yüzeyindeki her bir metal uygun potansiyelerde yukarıdaki tepkimenin tersi yönde yükseltgenme tepkimesine ilişkin pik elde edilir. Bu piklerin potansiyelleri, metallerin türü ile pik akımlarının büyüklüğü ise konsantrasyonu ile ilişkilidir. Bu akım büyüklükleri ile kalibrasyon grafikleri oluşturularak veya standart ekleme yöntemleri ile çalışarak nicel analizler gerçekleştirilir.

2.1.4.2. Katodik sıyırma voltametrisi (CSV)

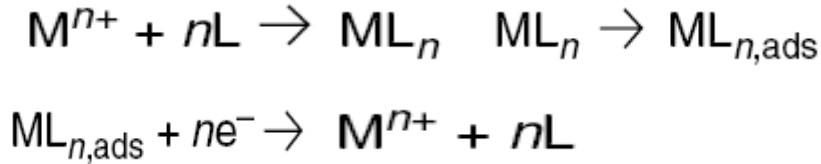
CSV uygulanan potansiyel programı açısından ASV nin tersidir. Burada civa tuzları çözünmeyen anyonların anodik bir potansiyel uygulaması ile elde edilen Hg(I) veya Hg(II) tuzları civa yüzeyinde biriktirilir ardından katodik potansiyel taraması yapılarak, tuzların yapısındaki civa elementel forma indirgenirken tuzlar sıyrılmış olur.



Bu metotla, siyanürler, sülfürler, tiyoller, halojenürler gibi bir çok organik ve anorganik anyonik kimyasal türün duyarlı nicel analizi mümkündür (Wang 2006).

2.1.4.3. Adsorptif sıyırma voltametrisi (AdSV)

Burada analizlenecek metal türü bir ligand ile etkileştirilerek, elektrot üzerinde adsorplanacak bir kompleks haline getirilir. Görüldüğü gibi, bu tekniğin biriktirme basamağı elektrokimyasal değil, fiziksel ve kimyasaldır. Sıyırma basamağında ise, elektrot yüzeyinde adsorplanan kompleks, metal veya bazı durumlarda ligand indirgenerek yüzeyden uzaklaştırılır. Sıyırma işlemi sırasında yüzeyde adsorplanan madde miktarı ile orantılı bir akım geçer bu akım büyüklüğünden yararlanarak nicel analiz gerçekleştirilir. Bu teknikte yüzeye adsorplanma, elektrot yüzeyi ve adsorplanacak kompleksin boyutları ile doğrudan ilişkilidir. Yüksek konsantrasyonlarda kalibrasyon grafiklerinde doğrusallıktan sapmalar meydana geldiğinden, yüksek konsantrasyonlar için uygun değildir. Düşük konsantrasyonlar için hassas ve duyarlı sonuçlar almaya elverişlidir (Wang 2006).



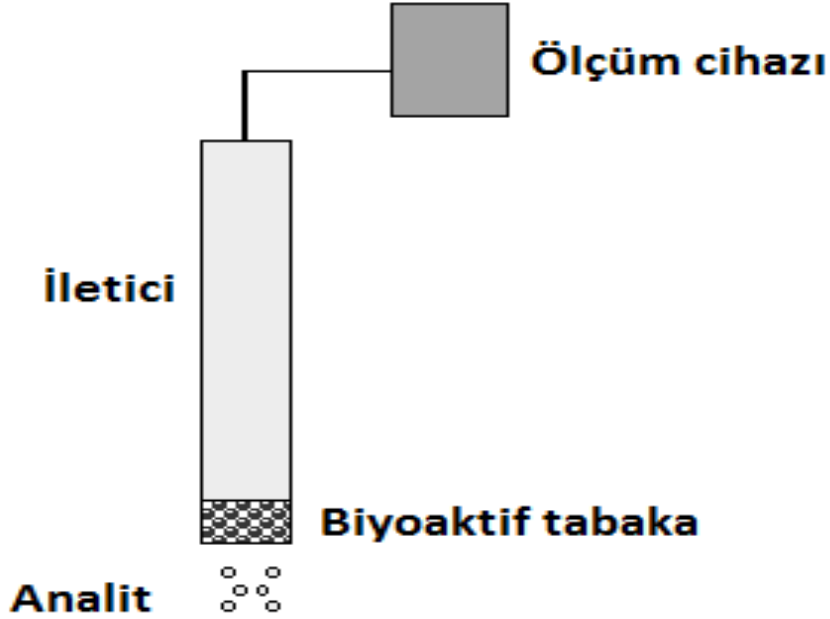
2.1.4.4. Potansiyometrik sıyırma voltametrisi (PSV)

Bu tekniğin biriktirme kısmı ASV dekine benzer şekilde, incelenecek metaller elektrokimyasal indirgeme ile civa ile amalgam oluşturacak biçimde elektrot üzerinde biriktirilir. Sıyırma basamağında ise, hücre potansiyostattan ayrılır ve potansiyometreye bağlanır. Hücre içerisine sabit hızla belirli bir yükseltgen eklenir. Yüzeydeki maddeler, yükseltgenme potansiyellerine göre sıra ile belirli potansiyellerde indirgenerek yüzeyden sıyrılır. Yüzeydeki maddelerin sıra ile yükseltgenmesi sırasında, potansiyel basamaklar şeklinde değişir. Potansiyel değişimini geçen süreye göre incelediğimizde,

her basamağın süresi, o potansiyelde yükseltgenen metalin miktarı ile orantılıdır (Wang 2006).

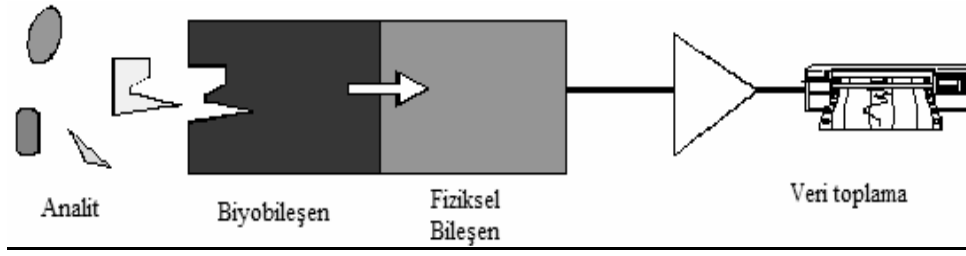
2.2. Biyosensörler ve Enzim Biyosensörleri

Biyosensörler biyolojik tepkimelerde hedef analitleri çoğunlukla yerinde veya in-vivo olarak izlemek ve belirlemek için kullanılan küçük algılayıcı sistemler veya aparatlardır. Birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle çok seçici bir şekilde etkileşerek onu tanımadır. Bu seçici etkileşme sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir (Turner 1987, Coutlet 1991).



Şekil 2.11. Biyosensörlerin şematik gösterimi (Telefoncu 1999).

Şekil 2.11 de bir Biyosensörün şematik gösterimi, şekil 2.12 de ise, genel olarak çalışma prensibi gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Biyosensörlerin genel olarak çalışma prensibi (Anonim 2009).

Biyosensörlerde kullanılan ve seçicilik sağlayan biyolojik bileşenler; enzimler, doku kesitleri, mikroorganizmalar, organeller, immuno ajanlar, nükleik asitler, reseptör moleküller gibi yapılardan oluşabilir. Fiziksel kısım ise, biyobileşenlerin biyolojik reaksiyonunu ölçebilir fiziksel bir sinyale dönüştüren yapılardır. Amperometrik ya da potansiyometrik esaslı elektrotlar, yarı iletken esaslı transistörler veya optik esaslı lifler gibi yapılardan meydana gelebilir (Hasançebi 2008).

Uygun biyobileşen ve fiziksel bileşen (transduser) seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması en önemli sorundur. Bu bağlanma işlemi biyobileşen immobilizasyonu olarak adlandırılır. Bu amaçla çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen biyobileşen ve fiziksel bileşene göre belirlenir. Biyobileşenlerin immobilizasyonu için, Kovalent bağlama, tutuklama, çapraz bağlama, adsorpsiyon, biyolojik bağlama,

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespiti ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Ayrıca, gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler, enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde de kullanılırlar (Hasançebi 2008).

Biyobileşeni enzim olan biyosensörlere enzim biyosensörleri denir. Biyosensör teknolojisinin tarihsel gelişimine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleri ile başladığı görülmektedir. 1962’ de Clark ve Lyons 1967’ de Uptike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrotları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır. Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler

özellikle amperometrik ve potansiyometrik temelli enzim elektrotları şeklinde ortaya çıkmışlardır (Dinçkaya 1999).

Enzimler, Canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden % 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir (Keha ve Kührevioğlu 1993). Enzimler diğer biyo moleküllere göre daha spesifik bir duyarlığa sahiptir, yani sadece istenilen moleküllere karşı duyarlılık gösterirler. Enzimler etki ettikleri maddeyle yani substratları ile çok hızlı etkileşirler. Bu nedenle, diğer biyosensörlere göre daha spesifik olan enzim biyosensörlerinin daha hızlı analiz gibi üstünlükleri vardır. Ayrıca enzim biyosensörleri ile çok az miktarda enzim kullanarak çalışmalar yapılabilir (Hasançebi 2008).

2.3. UV-VIS Spektroskopisi ve Uygulamaları

Elektromanyetik ışınım (radyasyon) ile maddenin etkileşmesini inceleyen bilim dalına spektroskopi denmektedir (Gündüz 1993). Bir örnekte bulunan atom, molekül veya iyonların, temel enerji düzeylerinden üst enerji düzeylerine geçişleri sırasında yaptıkları soğurum (absorpsiyon) veya uyarılmış taneciklerin temel hale dönerken yaydıkları elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve yorumlanması tüm spektroskopik tekniklerin ortak sürecidir.

Her madde üzerine düşürülen ışınlardan, sahip olduğu enerji düzeylerine uyan dalga boylarında olanları absorplama özelliği vardır. Absorplanan ışının dalga boyunun spesifikliğinden yararlanılabilen durumlarda bundan yararlanılarak nitel analiz yapılabilir. Bir maddenin absorplayacağı ışın şiddeti ise madde miktarı ile orantılıdır. Bundan yararlanılarak da nicel analiz yapılabilir. Bu amaçla madde üzerine çok çeşitli enerjilere sahip ışınlar gönderilebilir. Madde ile etkileşen ışının enerjisi değiştiğinde madde ile etkileşim mekanizması da değişir. Buna bağlı olarak ölçüm tekniğinin de değişmesi gerekir. Bu nedenle elektromanyetik spektrumun tümü için ölçüm yapılabilecek tek bir cihazın bulunması mümkün değildir. Elektromanyetik spektrumun farklı bölgeleri için farklı cihazlar kullanılır. Dalga boyu 190 nm – 1000 nm arasındaki mor ötesi (UV) ve görünür bölge (VIS) ışınları ile çalışılabilen cihazlara UV – VIS

spektrofotometreleri denir. Bu bölgedeki ışınların absorplanmalarının ölçümlerini temel alan analitik yöntemde UV – VIS Spektroskopisi denir (Aydoğdu 2007).

Absorpsiyon olayında, absorplanan ışının şiddeti **Lambert-Beer** eşitliği ile verilir. Buna göre;

$$A = \text{Absorbans} = \log I_0 / I = \epsilon \cdot L \cdot C$$

ϵ = Absorpsiyon katsayısı (L/mol.cm)

L (veya b ile gösterilir) = Işığın örnek içerisinde geçtiği ve etkileştiği yol (cm)

C = Konsantrasyon (mol/L)

Işığın geçiren bir kap içerisinde bulunan bir madde üzerine I_0 şiddetindeki monokromatik ışın demeti gönderilecek olursa demetten bir kısım ışın yansır (I_y) (ışın demeti çözeltiye dik olarak geldiği için çözelti kabının cidarına dik olarak geri döner), bir kısmı maddenin tanecikleri (iyon, molekül) tarafından absorplanır (I_a), bir kısmı çözeltide bulunan büyük veya büyükçe moleküller tarafından etrafa saçılır (I_d), bir kısmı da çözeltiden geçer (I). Bunlar arasında,

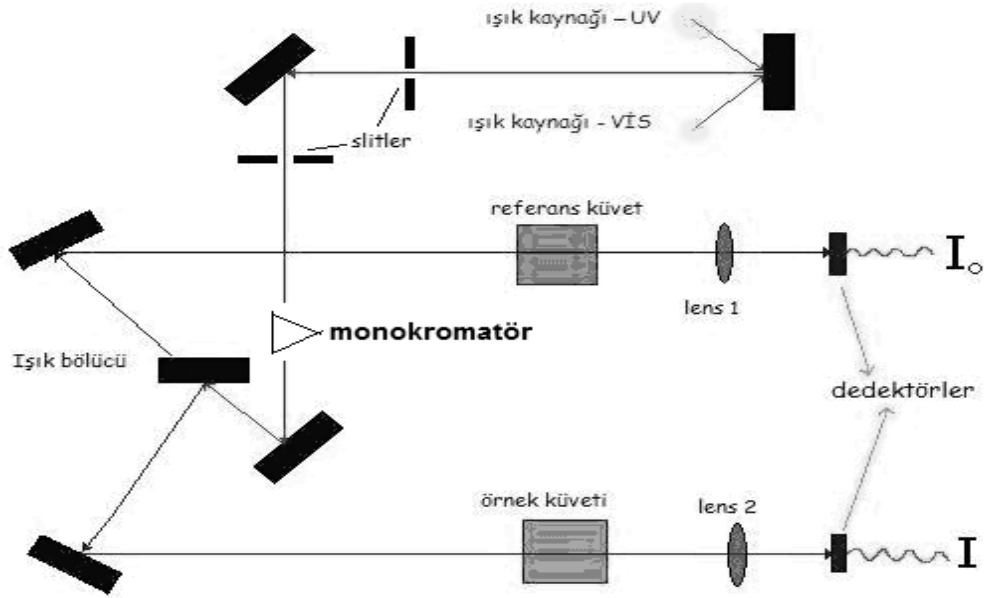
$$I_0 = I + I_a + I_y + I_d \text{ şeklinde bir bağıntı vardır.}$$

Burada amaç madde tarafından absorplanan ışık miktarını ölçmektir. Bu nedenle saçılma ve yansımada oluşan kayıpların engellenmesi gerekir. Bu amaçla I_0 şiddetindeki ışın demeti çözücünden ve incelenecek maddeyi içeren çözeltiden geçirilir. Saf çözücünden geçen ışık şiddeti I_0 olarak alınır. Maddeyi içeren çözeltide yansımaya, saçılma ve absorplama, saf çözücüde ise sadece yansımaya ve saçılma gerçekleşir. Burada yansımaya ve saçılmaların olabildiğince az olması, I_0 ile I arasındaki farkın yalnızca, ilgilenilen maddeler tarafında absorplanması istenir. Bu nedenle, spektroskopik tekniklerde çözeltinin berrak ve homojen olması çok önemlidir.

Lambert beer yasası belli koşullarda geçerlidir, bu koşullar sağlandığı koşulda, Absorbans (A) ile konsantrasyon (C) arasında doğrusal bir ilişki vardır. Ancak aşağıda belirtilen koşullarda tam olarak sağlanmadığı takdirde, sonuçlarda sapmalar meydana gelecektir. Öncelikle bu yasa, monokromatik ışın için geçerlidir, çalışılan ışında meydana gelen hatalar veya çalışılan ortamdan kaynaklanan saçılmalar sonucu, dedektöre kaçak ışın gelmesi hataya sebep olur. Bu yasaya göre, içerisinde çalışılan

çözelti homojen olmalıdır. C' un 0,01 M dan daha düşük olması gerekir, çünkü daha derişik çözeltilerde, n, kırılma indisi artacağından ve moleküller arası etkileşimler etkili olacağından, A-C arasındaki doğrusal ilişki bozulabilir. Ayrıca, aynı λ 'da absorpsiyon yapan birden fazla türün birbirinin absorpsiyonunu etkilememesi gerekir. Gerek cihazdan gerekse çalışılan çözeltilerden kaynaklanabilecek bu hata kaynakları ortadan kaldırıldığı durumlarda yöntem doğru sonuç verecektir.

UV-VIS spektroskopisi yönteminde kullanılan cihazın şekli, şekil 1.12 de gösterilmiştir.



Şekil 2.13. UV-VIS bölge spektrofotometresinin şekli (Anonim 2010).

Spektrofotometrenin temel kısımları; ışık kaynağı, monokromatör, örnek bölmesi ve ışınım gücünü belirleme işlevini üstlenen dedektörden oluşur.

UV bölgede D₂, veya H₂ lambaları, VIS bölgede ise W, Xe ARK veya civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır.

Monokromatör: Polikromatik ışıktan monokromatik ışın elde eden düzeneğe denir.

Dedektörler: Işık şiddetini ölçen düzeneklerdir.

UV-VIS spektroskopisi yönteminin başlıca uygulama alanları şunlardır;

1. Nitel Analiz: Analizi yapılacak olan bilinmeyen madde saflaştırıldıktan sonra uygun bir çözücüde çözülerek spektrumu alınır. Bu spektrum bilinen bileşiklerin aynı koşullarda çekilmiş spektrumları ile karşılaştırılır. Bu yöntem nitel analiz için çok uygun bir yöntem değildir. Çünkü moleküllerin absorpsiyon bantları oldukça geniştir, bazı kromoforların absorpsiyon bantları birbiri ile örtüşebilir, çözücü etkisi ile dalga boylarında kaymalar meydana gelebilir. UV-VIS bölgede karakteristik absorpsiyon yapan lantanit, aktinit ve bazı geçiş grubu metalleri dışında nitel analiz yapılması pek olası değildir. Nitel amaçlarla IR veya NMR bölgedeki karakteristik soğurumlardan yararlanılması daha yaygın bir durumdur.

2. Nicel Analiz: ışının absorplamasına dayanan analiz yöntemleri nicel analiz için oldukça yararlı ve güçlü yöntemlerdir. Bu yöntemlerin klasik yöntemlere göre önemli avantajları vardır;

- Analiz süresi kısadır.
- Doğruluk derecesi yüksektir. Analizlerdeki hata çoğunlukla % 0,1–0,2 civarındadır.
- Çoğunlukla bir karışımdaki maddeler bir ön ayırma işlemine gerek kalmaksızın, pek çok durumda bir arada analizleri yapılabilir.
- Hem organik hem de anorganik pek çok molekül UV – VIS bölge ışınları absorpladığından uygulama alanı geniştir (Anonim 4).

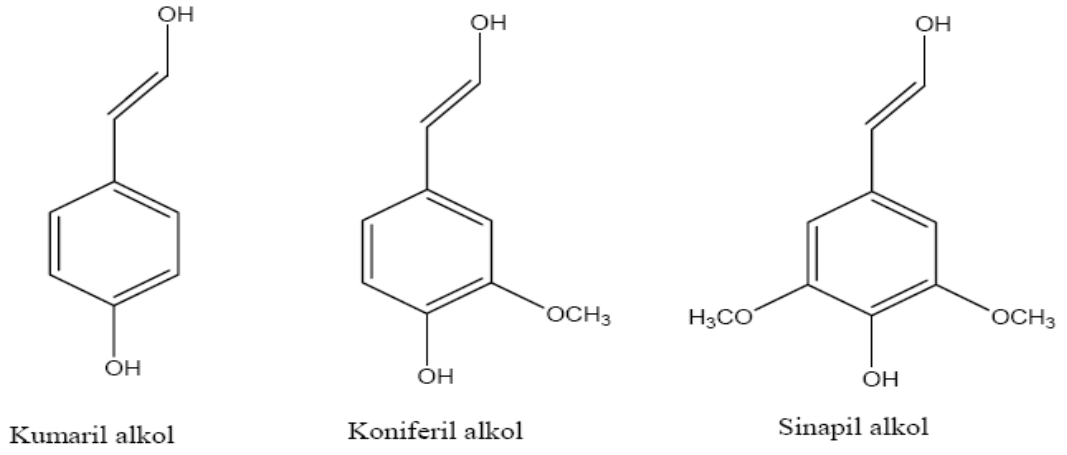
2.4. LİGNİN

Lignin, selülozdan sonra yeryüzünde bitkilerde en fazla bulunan doğal amorf polimer olup vanilin gibi aromatik gruplar taşıyan karmaşık bir yapıdır. Kimyasal yapısı bitkinin türüne ve morfolojik özelliklerine bağlı olarak değişir (Üner 2003). Lignin bitkisel yapılarda yaklaşık %25-35 oranında bulunmakta, hücre duvarlarına sağlamlık vermekte; etkiye, sıkışmaya ve büzölmeye karşı çok iyi direnç sağlayan karma bir yapı oluşturup odun hücreleri arasında bir yüzey görevi görmektedir.

2.4.1. Ligninin Yapısı

Lignin bir karbonhidrat olmamasına karşın doğada daha çok selüloz ve hemiselüloz ile bir arada bulunduğundan karbonhidratlar içinde incelenir. Ligninin sabit bir bileşimi yoktur ve çeşitli yapı taşlarından oluşmaktadır. Temel yapı taşı fenilpropan bileşikleridir (Üner 2003).

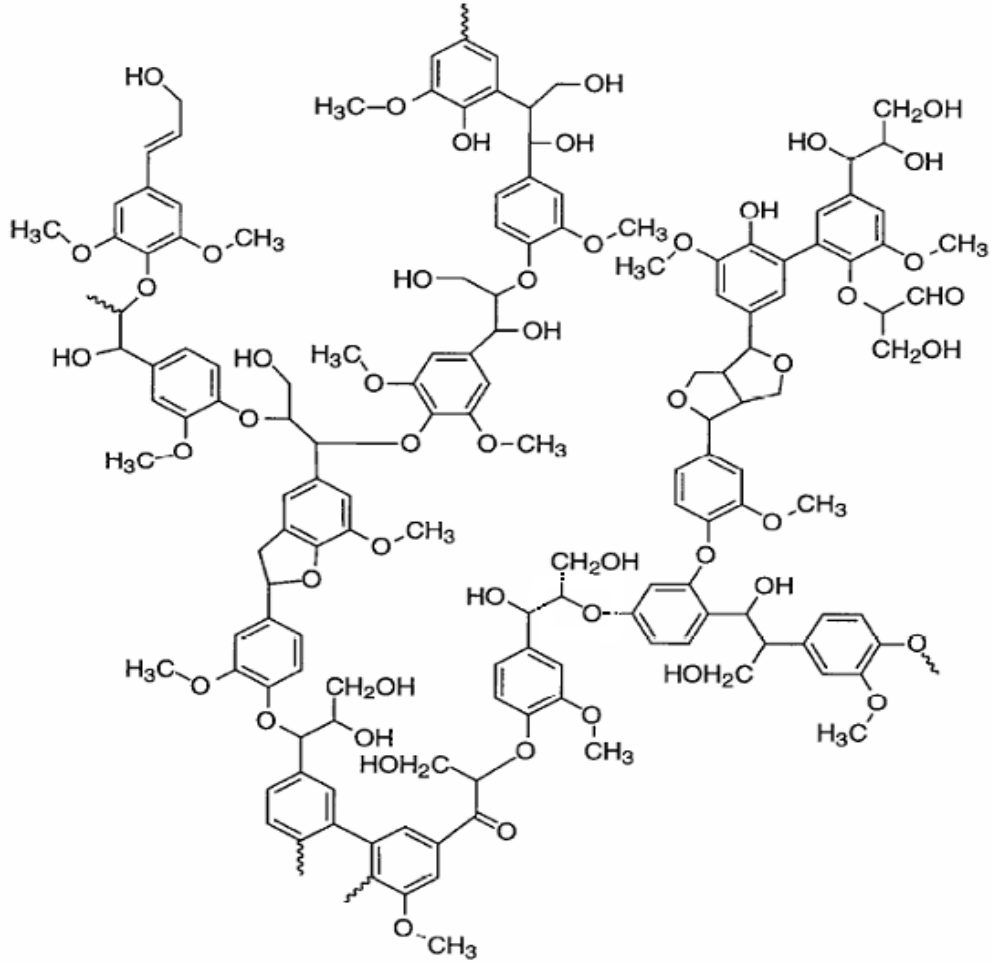
Ligninin genel yapısı koniferil, sinapil ve kumaril alkollerin (Şekil 1.13) dehidrojenatif polimerleşmesi ile aydınlatılmaya çalışılmıştır (Üner 2003).



Şekil 2. 14. Koniferil, sinapil ve kumaril alkollerin yapısı (Üner 2003).

Ligninin kompleks yapısı ve değişik yapıdaki bağların oluşumu bu monomerlerin fenoksi radikallerinin değişik şekillerde eşleşmesiyle meydana gelir. Bu radikallerin

birbiriyle eşleşmesinden dimerler oluşur. Oluşan bu dimerler tekrar oksitlenerek radikalleri oluşturur ve radikaller monomerlerle eşleştiğinde daha büyük bir molekülü meydana getirirler (Üner 2003). Bu süreç devam edip kompleks lignin yapısını oluşturur. 1977’de Adler tarafından benimsenmiş lignin model yapısı Şekil 1.14’deki gibidir.



Şekil 2. 15. 1977’de Adler tarafından benimsenmiş lignin model yapısı (Sezgin 2006)

2.4.2. Ligninin Önemi:

Ligninin kağıt endüstrisinde önemli bir yeri vardır. Lignin kağıtta renk sarılığına, yırtılmaya karşı direncinde azalmaya yol açar. Bu nedenle istenmeyen bir maddedir. Kağıt hamuru üretim işlemlerinde odunun yapısında bulunan ligninin çıkartılması ve minimum düzeye indirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle kağıt hamuru hazırlama ve ağartma işleminde polisakkaritlere zarar vermeden lignini uzaklaştırmak gerekmektedir. Kâğıt hamurunun ağartılmasında klor ağartma maddesi olarak kullanılmaktadır. Aşırı klor kullanımına bağlı olarak atık sularda klorca zengin fenolik ve ligninli bileşikler mevcuttur. Lignin ve molekül üzerindeki fonksiyonel gruplar bu atık sularda renklenmeye yol açabilmektedir. Fenolik bileşiklerin büyük bir kısmı da ligninden kaynaklanmaktadır. Klorlu fenolik ve lignin bileşikleri aşırı derecede çevre kirliliği meydana getirmekte ve özellikle atık sularda kanserojen özellikte olan kloroformu oluşturmaktadır. Yapılan literatür çalışmalarında, bu tür atık sularda 12 tür fenolik bileşiğin mevcut olduğu rapor edilmiştir (Uğurlu 2003).

Ayrıca lignin, biyoyakıt üretiminde de istenmeyen bir yapıdır. Bitki hücrelerinde, birlikte bulunduğu; selüloz, hemiselüloz, pektin gibi biyolojik polimerler, basit şekerlere dönüştürüldükten sonra biyoyakıt üretimi için kullanılabilir çok uygun besin deposudurlar. Ancak lignin varlığı bu uygulama için güçlü bir engelleyici etki yapar. Ayrışmaya karşı güçlü direnç gösterebilen bir fenolik polimer olan lignin selüloz, hemiselüloz gibi moleküllerinin etrafında bulunur, bu moleküller lignin moleküllerinin arasında gömülüdür. Bu durumda, selüloz, hemiselüloz gibi molekülleri çeşitli biyoyakıt ürünlerinin üretiminde kullanılabilir, basit şekerlere dönüştürebilecek enzimlerin etkisi lignin tarafından engellenmektedir. Böylece biyoyakıt üretiminde beklenenden daha düşük verim elde edilir (Weng ve ark. 2008).

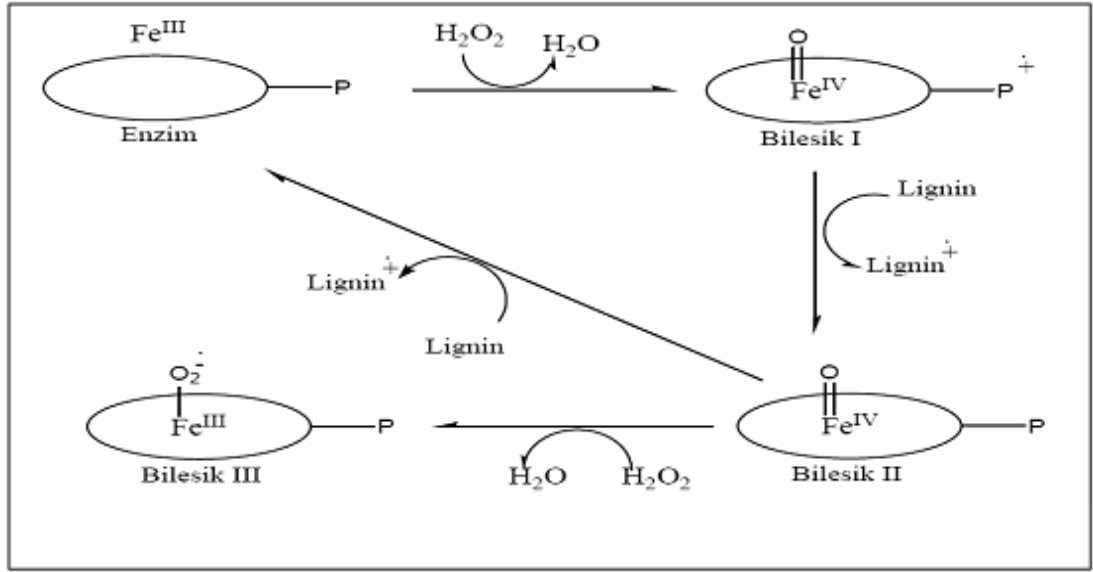
Lignin'in bitkisel materyallerde selülozla beraber bulunmasının yarattığı bir başka sorun da hayvan besiciliğinde karşımıza çıkmaktadır. Bilindiği üzere, et ve süt üretimi yönünden önem taşıyan işkembeli hayvanların temel besinini ot ve saman gibi lignoselülozlu maddeler oluşturmaktadır. Bu grup hayvanlar kendi enerji ve biyosentez metabolizmaları için gerekli enerji kaynağı ve yapı taşlarını selülozun hidroliz ürünlerinden sağlarlar. Selüloz hidrolizi bu grup hayvanların işkembelerinin bir bölümü

olan rumen'in normal florasında var olan anaerobik ve selülozu hidrolize edebilen karaktere sahip rumen bakterilerince gerçekleştirilir. Ne var ki, söz konusu bakteriler bu işlevlerini sentezledikleri selülaz enzimiyle gerçekleştirdiklerinden, ot ve saman gibi maddelerde yer alan lignin yine bu maddelerde bulunan selüloz'un rumen içinde yetersiz ve yavaş sindirilmesine neden olmaktadır. Bu bakımdan, son yıllarda saman gibi temel besin maddelerinin delignifikasyonla rumen-içi sindirimini arttırmaya yönelik çalışmalar bazı araştırma kuruluşlarında gerçekleştirilmiştir (Kolankaya ve Sağlam 1988).

2.4.3. Ligninin Parçalanması

Lignin biyodegradasyonu (biyolojik parçalanması) ve transformasyonu ile ilgili çalışmalar kısa bir geçmişe sahiptir. Yapılan bu çalışmaların sonucunda, doğadaki ligninin biyolojik parçalanmasında daha çok beyaz-çürükçül mantarların etkin oldukları saptanmıştır (Kolankaya ve Sağlam 1988). Özellikle bu mantar grubuna giren *Phanerochaete chrysosporium*'la lignin parçalanması ile ilgili dünyanın çeşitli laboratuvarlarında çok sayıda araştırma yapılmış ve halen de yapılmaktadır. (Kolankaya ve Sağlam 1988). *Phanerochaete chrysosporium*, içerdiği hücre dışı, LIP ve MnP enzimleri ile ligninin biyolojik parçalanmasında önemli rol oynar (Bacocchi ve ark. 2002).

Ligninin enzimatik yollarla oksidasyon süreçlerinde *Phanerochaete chrysosporium* mantar kültüründen izole edilmiş olan (LiP) ve Mn-peroksidaz enzim (MnP) grupları kullanılmaktadır. Bu iki ana enzim grubu heme-protein olup reaksiyon bir elektron transfer mekanizması ile gerçekleşmektedir (Crestini ve ark. 1999). Şekil 1. 15'te LIP enziminin, lignini parçalamasına ait döngü gösterilmiştir.



Şekil 2. 16. LiP enzimi etkisi ile ligninin parçalanma döngüsü (Crestini ve ark. 1999).

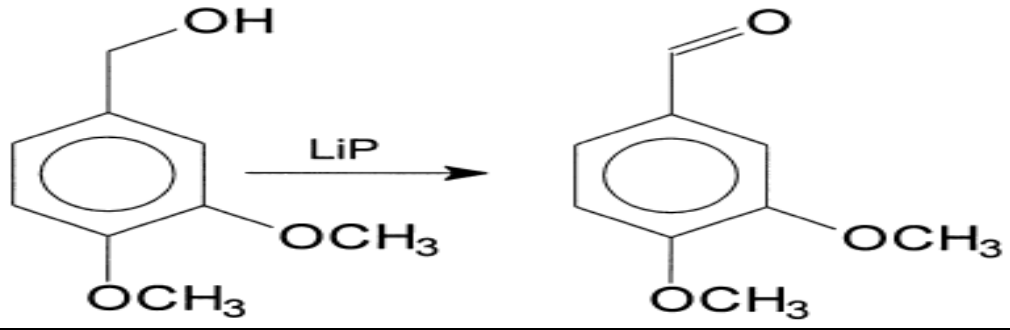
Şekil 2.16'daki döngüyü incelersek, demir(III) porfirin yapısı içeren enzim, ortamda bulunan H_2O_2 tarafından yükseltgenerek, demir(IV) yapılı "+" yüklü radikalik bileşik I yapısı meydana gelir. Ardından bu bileşik, ligninden bir elektron alarak lignin radikali meydana getirir kendisi ise yüksüz, demir(IV) yapılı bileşik II ye dönüşür. Oluşan bileşik II yapısı da ligninden bir elektron alarak lignin radikali oluştururken kendisinde bir elektron alarak, demir(III) yapılı ilk haline dönüşür. Böylece bir çevrim tamamlanmış olur.

2.5. Veratril Alkol ve Veratril Aldehit

Veratril alkol (3,4-dimetoksibenzil alkol, VA), içerdiği hücre dışı, LiP ve MnP enzimleri ile, ligninin biyolojik parçalanmasında önemli bir rol oynadığı bilinen bir mantar olan *Phanerochaete chrysosporium* un ikincil metabolitidir (Baclocchi ve ark. 2002). Veratril alkol lignin için model bir bileşiktir. LiP enziminin, lignini biyolojik olarak parçalamasında mediatör yani elektron taşıyıcı görevi görür.

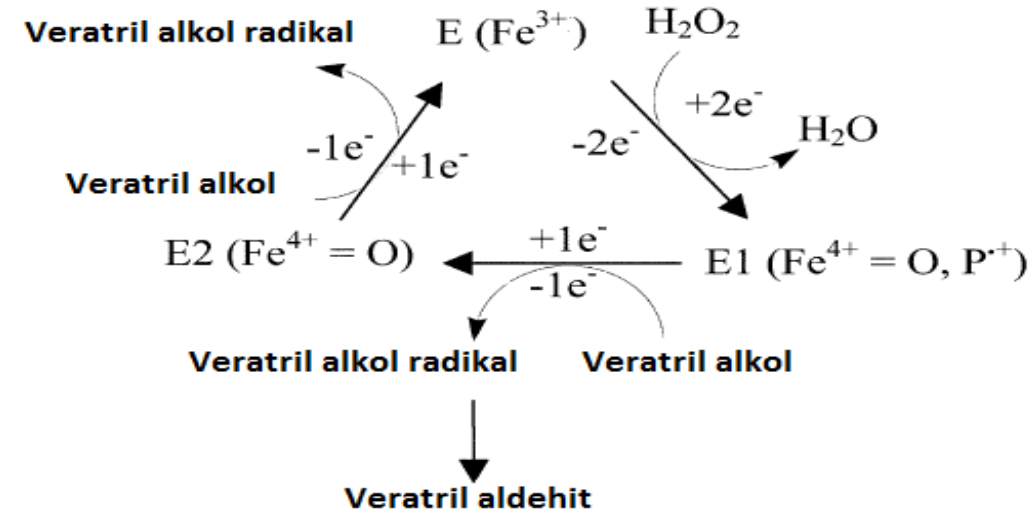
Veratril alkolün, ligninin biyolojik parçalanmasında çeşitli fonksiyonları vardır. *Phanerochaete chrysosporium* un ligninolitik sisteminin, hücre dışı lignin peroksidaz seviyesinin artmasına sebep olur. Veratril alkolün kendisi de lignin peroksidaz ile yükseltgenir.

Veratril aldehit, veratril alkolün yükseltgenmesi ile oluşur. Lignin ve LiP enzimi ile ilgili birçok çalışmada, veratril alkolün yükseltgenmesi ile oluşan veratril aldehitin miktarındaki artışın UV-VIS spektroskopi yöntemi ile incelenmesinden yararlanılmaktadır.



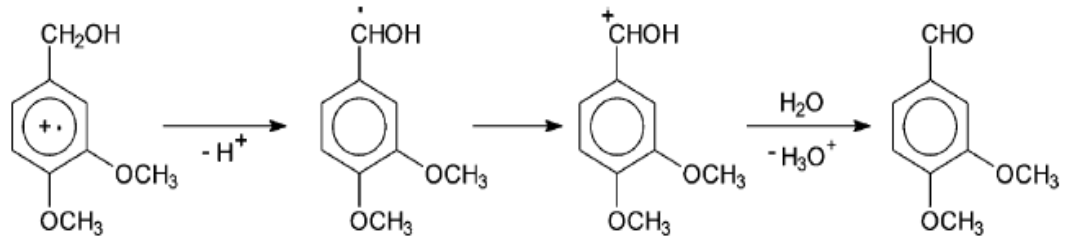
Şekil 2.17. Veratril alkol ve veratril alkolün moleküler yapısı ve lignin peroksidaz enzimi (LiP) ile birbirine dönüşmesi

Şekil 2.17’de VA ve VAD moleküllerinin yapıları gösterilmiştir. VA, ligninin, LiP enzimi etkisi ile parçalanması sırasında, elektronlarını vererek VAD e yükseltgenir.



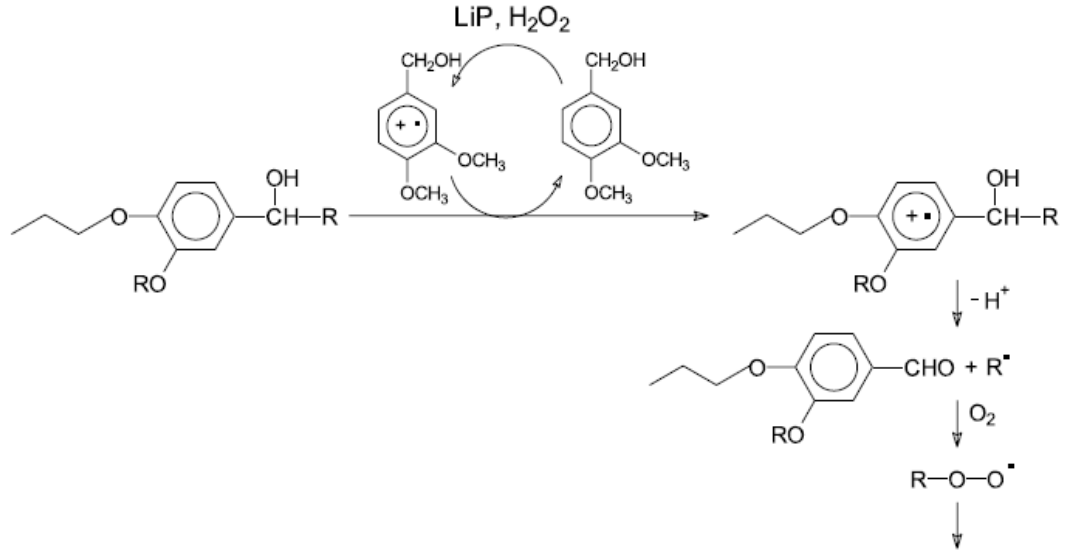
Şekil 2.18. Lignin peroksidaz enzimi etkisi ile veratril alkolün yükseltgenmesi (Lee ve Moon 2003)

Şekil 2.18’de, LiP enzimi etkisi ile veratril aldehite yükseltgenmesi ile ilgili döngü gösterilmiştir. Burada, E (Fe³⁺) yapısı, Fe³⁺ iyonu içeren LiP enzimidir. Enzim, E yapısı, ortama eklenen ya da ortamda çeşitli yollarla oluşturulan H₂O₂ molekülü tarafından yükseltgenerek, E1 yapısını oluşturur. Bu yapıya ortamda bulunan veratril alkol bir elektron vererek E2 yapısının oluşmasını sağlarken, veratril alkolün kendisi de veratril alkol radikaline, ardından da veratril aldehite dönüşür. Oluşan bu E2 yapısı, bir veratril alkol molekülünün bir elektronunu vererek radikal oluşturması ile başlangıçtaki E yapısına döner, böylece döngü tamamlanmış olur (Lee ve Moon 2003).



Şekil 2.19. Veratril alkol radikalinden veratril aldehitin meydana gelmesi (Baclocchi ve ark. 2002)

Veratril alkol radikalinin veratril aldehite dönüşümü, Şekil 2.19’da gösterilmiştir.



Şekil 2.20. Ligninin, LIP katalizörlüğünde parçalanmasında VA'nın mediatörlüğü (Bacocchi ve ark. 2002)

Şekil 2.20'de gösterildiği gibi ligninin, H₂O₂ varlığında, LIP enzimi katalizörlüğünde parçalanması sırasında, enzim etkisi ile bir elektronunu lignine vererek radikalik katyona dönüşür. Ardından bu radikalik katyon şekil 2.19 de görüldüğü gibi veratril aldehite dönüşür. Bu sırada enzim etkisi ile lignin molekülü parçalanmış olur ve veratril alkol bu parçalanmada elektron taşıyıcı görevi görmüş olur.

2.6. Veratril Alkol ve Aldehit Hakkında Literatürde Yer Alan Çalışmalar

Veratril alkol veratril aldehit redoks çiftinin tek tek veya birlikte nicel analizine yönelik herhangi bir literatür bilgisine ulaşamamıştır.

Lee ve Moon (2003), LiP kullanarak, elektrokimyasal ve enzimatik reaksiyonları birleştirerek, veratril alkolün elektroenzimatik olarak yükseltgenmesi ile veratril aldehit oluşumunu incelemişlerdir. Reaksiyon esnasında, ortamda var olması gereken H_2O_2 nin, dışarıdan eklenmesinin ortaya çıkaracağı sorunlardan kurtulmak amacı ile elektrokimyasal olarak deneysel ortamda oluşturulması ile çalışma yapılmış ve bu yeni elektroenzimatik yöntemin etkili olacağı gösterilmiştir. Bu çalışmada; enzim miktarı, pH ve uygulanan potansiyelin etkileri incelenmiştir. Çalışma için optimum pH' nin 3,0, uygulanması gereken optimum potansiyelin ise $-0,4v$ olduğu bulunmuştur.

Cancel ve ark (1993), *Phanerochaete chrysosporium* kültürlerinin ligninolitik sisteminde lignin ve veratril alkolün rolünü araştırmışlardır. Çalışmada, kültürler üzerine, 0,4 – 2,0 mm veratril alkol eklenmiş ve artan veratril alkol konsantrasyonu ile LiP aktivitesinin de arttığı görülmüştür. Çalışmada, LiP enziminin aktivitesi, tien, kirk (1983) te belirtildiği gibi, enzimatik süreçle veratril alkolün yükseltgenme ürünü olan veratril aldehitin 310 nm dalga boyunda yaptığı absorpsiyondan yararlanarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda, veratril alkolün LiP aktivitesini artırıcı etki yaptığı bulunmuştur.

Kawai ve Umezava (1986), *Corilous versicolor* adlı bir mantar türünün ligninolitik kültürü içerisinde veratril alkolü bulmuşlardır. Bulunan maddenin veratril alkol olduğu, gerçek dimetoksi benzil alkol ile H-NMR spektrumlarının kıyaslanması ile doğrulanmıştır. Ardından elde edilen veratril alkolün, ligninin biyolojik parçalanmasındaki rolü incelenmiştir. Elde edilen veratril alkol, *Phanerochaete chrysosporium* kültürü içerisine eklenmiş, kültür içerisindeki ligninolitik aktivite ve LİP enzimi üretiminin artış gösterdiği ispatlanmıştır.

Schoemaker ve Piontek (1996), LiP enzimi ve ligninin etkileşmesi ile ilgili mekanizmayı incelemiştir. Çalışmada LiP ın öncelikle H_2O_2 tarafından yükseltgenerek LiP1 formuna geçtiği, yükseltgenmiş bu formun etki ettiği veratril alkolden bir elektron alarak LiP2 haline dönüşürken veratril alkol radikalik katyonu oluşumuna yol açtığı,

LiP2 formundaki bu enzimin başka bir veratril alkole etki ederek tekrar veratril alkol radikalik katyonu oluşturduğu ve bu sırada enzimin ise tekrar ilk haline LiP geçtiği ve döngünün tamamlandığı gösterilmiştir.

Leisola, Schmidt ve Fiechter (1986), bazı lignin parçalanmasında kullanılan mantarların ikinci metaboliti olan veratril alkolün ölçümü için hızlı ve hassas bir yöntem geliştirmiştir. Bu yöntem, veratril alkolün, *Phanerochaete chrysosporium*undan elde edilen ligninaz tarafından veratril aldehite yükseltgenmesine dayanmaktadır. Saflaştırılmış enzimler veratril alkolü %75 oranında veratril aldehite ve bazı tanımlanmayan ürünlere yükseltgemektedir. Enzimatik metot *Phanerochaete chrysosporium* kültürleri içerisindeki veratril alkolü ölçmek için kullanıldı ve geleneksel olarak kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografi ile aynı sonuçları verdi. Metotun yararları ve sınırları tartışıldı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

3.1.1. Potansiyostat ve elektrokimyasal sistem

Bütün elektrokimyasal teknikler Bioanalytical System Inc.' nin basi epsilon model potansiyostat ve elektrokimyasal sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu potansiyostat ile katı elektrotlarla yapılan, voltametik çalışmalar için BASİ C3 çalışma hücre standı, civa elektrot ile yapılan çalışmalar ise, BASİ CGME çalışma hücre standı kullanıldı.

Voltametik çalışmalarda, çalışma elektrodu olarak, BASİ marka, MF-2012 kodlu, 3mm çaplı Camsı Karbon Elektrot (GCE), BASİ marka, MF-2013 kodlu, 1,6 mm çaplı Platin Elektrot ve el yapımı yaklaşık 3 mm çaplı grafit elektrotlar kullanılmıştır. Çalışma elektrotları her ölçümden önce yaklaşık 15 s boyunca 40 µm alumina ve naylon parlatma pedleri kullanılarak parlatılmıştır. Elektrot yüzeyleri zaman x400 ve x800 büyütme metal mikroskobu kullanılarak incelenmiş, olabildiğince derin çizik ve yüzey olumsuzluklarından kaçınılmaya çalışılmıştır.

Çalışmalarda, yardımcı elektrot olarak, BASİ marka, MV-1032 kodlu, 7.5 cm uzunluğunda, platin tel elektrot kullanılmıştır. Referans elektrot olarak ise, BASİ marka, MF-2052 kodlu, RE-5B Ag/AgCl Referans Elektrot kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan cam hücreler ise, 50 mm çapında, yaklaşık 20 mL örnek alabilen BASİ marka MR-1208 kodlu hücreler kullanılmıştır.

3.1.2. UV-VIS Spektrofotometre

Spektroskopik çalışmalar, HITACHI marka U-3900H UV-VIS spektrofotometre ile gerçekleştirildi. Hellma marka, 100-QS Quartz küvetler kullanılarak çalışılmıştır.

3.1.3. Diğer Alet ve Cihazlar

pH Metre: Çalışmamızdaki pH ölçümleri, Thermo marka, Orion 4-Star Plus, -2.000 ile +19.999 arasında pH ölçümü yapabilen pH metre ile yapılmıştır. pH elektrodu olarak, 8102BNUWP kodlu Orion cam pH elektrodu kullanılmıştır.

Hassas terazi: Kütle ölçümleri, SHIMADZU marka AUW220D kodlu, 0,00001g hassasiyette ölçüm yapabilen hassas terazi ile yapılmıştır.

Manyetik karıştırıcı: WiseStir marka ASH-20D kodlu, 1500 rpm döndürme kapasiteli manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

Etüv: Elektro-mag marka M5040p kodlu etüv kullanılmıştır.

Mikropipetler: Eppendorf marka, 0,5 µL- 5000 µL arasında hacim alabilen mikropipetler ve mikropipet uçları kullanılmıştır.

Saf su cihazı: Ultra saf su eldesi için, Human Corporation Zeneer Power I ultra saf su cihazı kullanılmıştır.

Çalışmalarda O₂ giderimi için linde marka, %99,999 saflıkta argon gazı kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasalların adı, saflığı ve üretici firması

Kimyasalın adı	Saflığı	Üretici firma adı
Veratril alkol	%98	Merck
Veratril aldehit	%99+	ACROS Organics
Sodyum hidroksit	≥%97	Merck
Borik asit	%99,5	Merck
Amonyum klorür	%99,5	Ridel-de Hoen

Tartarik asit	≥99,5	Merck
Potasyum nitrat	≥99,0	Merck
Disodyum tartarat dihidrat	≥99,5	Merck
Sodyum asetat	≥99,0	Merck
Amonyum nitrat	≥99,0	Merck
Fosforik asit	%85	Ridel-de Hoen
Asetik asit (glacial)	%99,8	Merck
HCl	%37	Ridel-de Hoen
Disodyum hidrojen fosfat	%99,5	Merck
Potasyum hidroksit	%85	Merck
Amonyak	%95	Merck
H ₂ O ₂	%35	Merck
Nitrik asit	%69,8	CARLOERBA
Sülfürük asit	%95-98	Merck

3.1.5. Çalışmada kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları:

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan tampon çözeltiler ve kullanıldığı pH aralıkları.

Tamponun adı	Çalışmada kullanıldığı pH aralığı
Asetat tamponu	2,5-6,0
Amonyum amonyum klorür tamponu	7,0-9,4
Sodyum tartarat tamponu	3,0-4,5
Britton-Robinson tamponu	2,0-9,0

a) **Asetat tamponu:** 8,2 g susuz sodyum asetat 800 ml saf su da çözülür. Çözeltinin pH si, buzlu asetik asit veya sodyum hidroksit kullanılarak, çizelge 2.2 gösterilen pH değerlerinden istenilen pH ye ayarlanır ve çözelti 1 L'ye tamamlanarak istenilen pH de tampon hazırlanmış olur.

b) Amonyum/amonyum klorür tamponu: 5,4 g amonyum klorür 900 ml saf su da çözülür ve tamponun pH si amonyum hidroksit ile istenilen pH ye ayarlanır ve tampon 1 L ye tamamlanır.

c) Sodyum tartarat tamponu: 15 g tartarik asit 500 ml saf su içerisinde çözülür ve sodyum klorür eklenerek pH si ayarlanır. Ardından çözelti 1 L ye tamamlanır ve tartarat tamponu hazırlanmış olur.

d) Britton-Robinson tamponu: 100 ml lik tampon hazırlamak için 0,04 M asetik fosforik ve borik asit alınır, belli miktar saf su ile çözelti haline getirilir, sodyum hidroksit ile pH si istenilen hale getirilir ve çözelti 100 ml ye tamamlanır.

3.2 Kullanılan Teknikler

Elektrokimyasal tekniklerden, yükseltgenme veya indirgenme yönünde elektroaktifliğin belirlenmesi amacıyla LSV ve/veya CV, daha düşük tayin sınırlarındaki analizlerde kullanılabilecek yüksek akım büyüklüğüne sahip pikler elde etmek amacıyla DPV, SWV tekniklerinden yararlanılmıştır.

Spektroskopik çalışmalarda 120-300 nm/dakika tarama hızı ile 2 nm slit açıklığı ile 200-1000 nm dalga boyu aralığında spektrumlar alınmıştır.

Elektrokimyasal ve spektroskopik çalışmaların tümü oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Klima ile oda sıcaklığı denetlenen laboratuvar sıcaklığı 25 ± 3 °C arasında tutulmaya çalışılmıştır.

4. BULGULAR

Veratril alkol (VA) – Veratril aldehit (VAD) redoks çiftinin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi ve birbirlerinin yanında analizlenebilirlikleri ve H₂O₂ varlığında doğrudan nicel analizlerinin yapılabirliklerini belirlemeye yönelik olarak tamamlanan çalışmaları, elektrokimyasal yöntemlerin uygulandığı voltametrik çalışmalar ve UV-VIS spektroskopik çalışmalar olmak üzere iki başlık altında toplamak mümkündür.

4.1. Voltametrik Çalışmalar

Voltametrik çalışmalar genel olarak Basi cell stand üzerinde, 20 ml örnek hacimleri ile, referans, yardımcı ve çalışma elektrotları kullanılarak gerçekleştirildi.

CV çalışmaları çoğunlukla potansiyostat üzerinden okunan rest potansiyel (denge potansiyel) değerinden başlatılmış, yine aynı potansiyelde sonlandırılarak tek çevrim üzerinden tamamlanmıştır.

Voltametrik çalışmalarda, x eksenindeki potansiyel değerleri, Ag/AgCl/3 M NaCl referans elektroda karşı verilmiş, voltamogram gösteriminde IUPAC gösterimleri benimsenmiştir.

Çalışma elektrodu, referans elektrot ve çalışma sisteminin kontrolü açısından belli aralıklarda ve kuşkulanan durumlarda, 6 mM K₃Fe(CN)₆ içerisinde -200 +800 mV gerilim aralığında CV çalışması yapılarak karşılaştırma yapılmıştır.

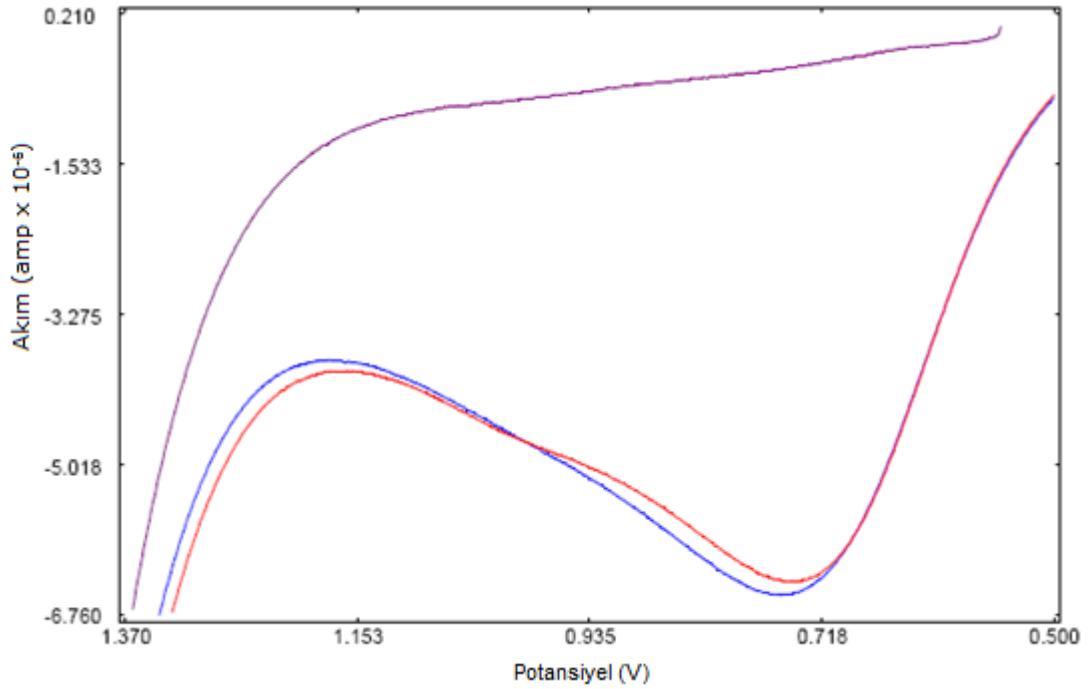
4.1.1. H₂O₂ ile ilgili çalışmalar

Ligninin, lignin peroksidaz enzimi (LiP) tarafından parçalanması sırasında enzimatik süreçte, oluşan H₂O₂ molekülüne bağlı olarak VA → VAD dönüşümü gerçekleştiği için, öncelikle çalışma ortamında H₂O₂ molekülüne duyarlılık bölgesi ve sınırlarını belirlemeye yönelik olarak bir seri voltametrik çalışma yapılarak H₂O₂ için karakteristik pikin optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi.

Bu çalışmalar dâhilinde platin elektrot (PtE), camsı karbon elektrot (GCE) ve grafit elektrotlar (GE) olmak üzere üç tip çalışma elektrodu ile farklı tampon çözeltiler ve pH değerlerinde 2 mM H₂O₂ içerisinde LSV ve CV çalışıldı.

4.1.1.1. H₂O₂ için PtE ile yapılan çalışmalar

Analizlemeye çalıştığımız maddelerin, mediatör olarak kullanıldığı, enzimatik süreçte kullanılan lignin peroksidaz enziminin, en iyi çalıştığı pH değerleri, asidik bölgede, pH 2- 4 arasında olduğu bilinmektedir. Ancak incelemede daha geniş bir aralıkta, asetat tamponu ile pH 2,5-6,0, amonyak tamponu ile pH 7.0-9.4 arasında, tartarat tamponu ile ise, pH 3-4,5 arasında denemeler yapıldı. Bu çalışmalarda elde edilen voltamogramlar üzerine çözülmüş oksijenin uzaklaştırılmasının etkisi incelendi.

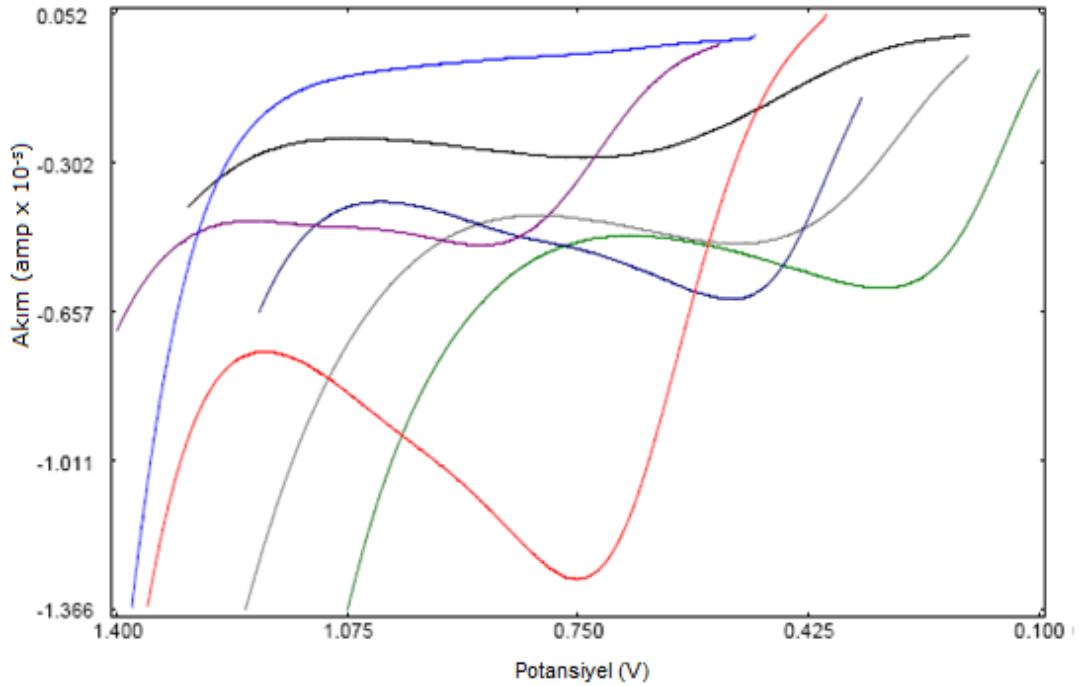


Şekil 4.1. pH 3,5 asetat tamponu içerisinde, PtE ile 2 mM H₂O₂ çözeltisinde çözülmüş oksijen gideriminin LSV üzerine etkisi

Çözülmüş oksijen giderme işlemi yapılarak ve **oksijen giderme işlemi yapılmadan, zemine ait** LSV ler

Şekil 4.1. de pH 3,5 asetat tamponu içerisinde, oksijen giderme işlemi yapılarak ve yapılmadan elde edilen LSV ler gösterilmiştir. LSV ler incelendiğinde O_2 gideriminin H_2O_2 yükseltgenme piki üzerinde iyileştirici bir etki yapmadığı görüldü. Farklı tamponlar içerisinde, oksijen giderimi ile ilgili yapılan çalışmalarda da oksijen gideriminin piklerde iyileştirici bir etki göstermediği görüldü, bu nedenle ilerleyen çalışmalara oksijen giderme işlemi yapılmadan devam edildi.

H_2O_2 için, LSV ile gerçekleştirilen çalışmalarda, yapılan CV ve LSV teknikleri ile elde edilen voltamogramlar incelendiğinde, H_2O_2 ye ait anodik bölgede, 350-850 mV arasında, zeminde var olmayan, H_2O_2 eklenmesinde sonra ortaya çıkan bir pik gözlemlendi. Bu pikin potansiyelinin ve akım büyüklüğünün, içinde çalışılan tampon çözeltinin pH sine bağımlı olduğu incelenen LSV eğrilerinden görüldü.

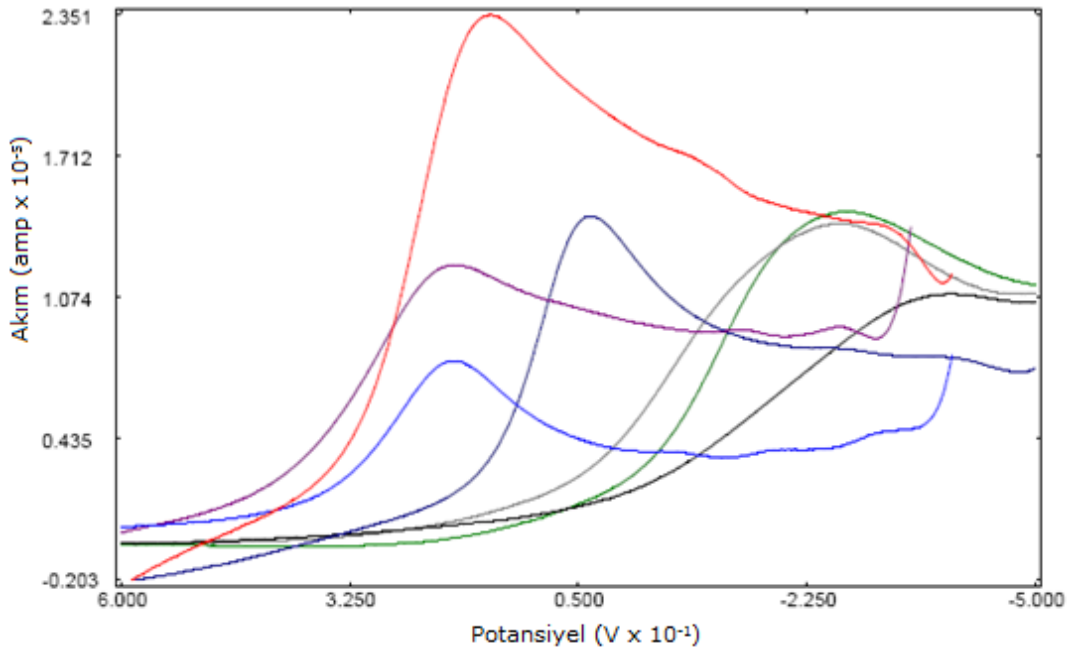


Şekil 4.2. Çeşitli pH lerde ve farklı bileşimli tampon çözeltiler içerisinde, PtE ile 2 mM H_2O_2 çözeltisi için elde edilen katodik yöndeki LSV ler

pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, pH 2,5 asetat tamponu içerisinde, pH 6,0 asetat tamponu içerisinde, pH 7,0 amonyak tamponu içerisinde, pH 8,0 amonyak tamponu içerisinde, pH 9,0 amonyak tamponu içerisinde, Zemine ait voltamogram (pH 3,5 tartarat tamponu)

Şekil 4.2 de gösterilen LSV lerde, çalışılan tampon çözeltinin pH si 2,5 ten, 9,4 e çıkmasıyla, elde edilen anodik pikin potansiyelinin, +850 mV dan +320 mV potansiyele kadar kaydığı gösterildi.

H₂O₂ için, LSV kullanılarak katodik yönde tarama ile de çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalara ait voltamogramlar Şekil 4.3 de gösterilmiştir.



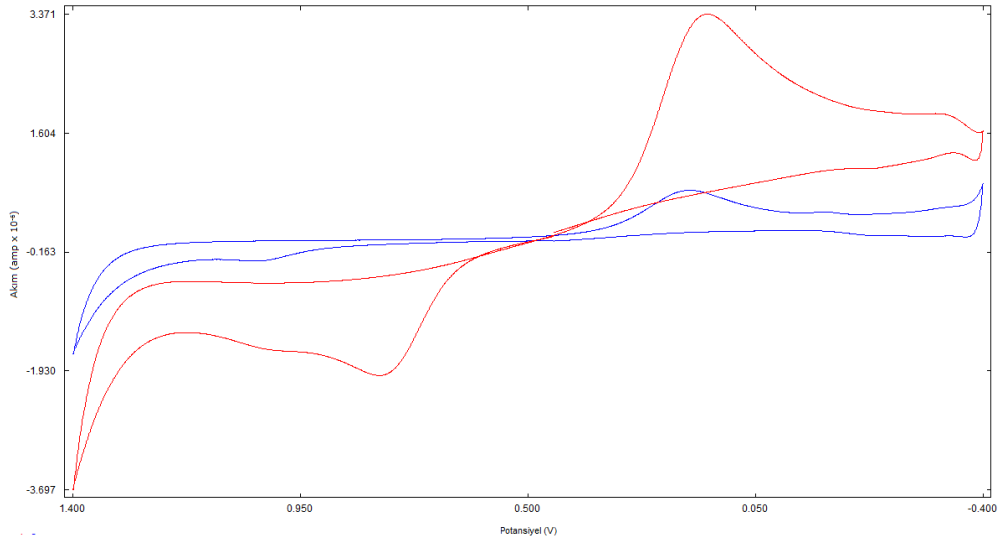
Şekil 4.3. Çeşitli pH lerde ve farklı bileşimli tampon çözeltiler içerisinde, PtE ile, 2 mM H₂O₂ çözeltisi için elde edilen anodik yöndeki LSV ler

pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, pH 2,5 asetat tamponu içerisinde, pH 6,0 asetat tamponu içerisinde, pH 7,0 amonyak tamponu içerisinde, pH 8,0 amonyak tamponu içerisinde, pH 9,0 amonyak tamponu içerisinde, zemine eğrisi (pH 3,5 tartarat tamponu)

Katodik tarama ile elde edilen voltamogramlar incelendiğinde, yaklaşık +225 mV potansiyel civarında, zemine de var olan pikin akım büyüklüğünde artış gözlenmiştir. Anodik bölgede de pikin yerinin, çözelti pH sine bağımlı olduğu görülmüştür. pH değerinin 2,5 ten 9,4 e yükselmesi ile katodik yöndeki bu pikin yeri +225 mV dan -260 mV potansiyele kadar kaymıştır.

PtE ile H_2O_2 için yapılan çalışmalarda elde edilen anodik ve katodik yöndeki LSV incelendiğinde; katodik bölgedeki pik, zeminde de var olan bir pikin büyümesi şeklinde, anodik yöndeki ise, zeminde olmayıp H_2O_2 eklenmesi ile ortaya çıkan bir pik şeklinde olduğu görüldü. Bu nedenle, H_2O_2 konsantrasyonu ile ilgili çalışmalar için, pH 3,5 tartarat taponu içerisinde en duyarlı analizler için en büyük akım değerlerinin elde edildiği, anodik yönde yaklaşık 700 mV potansiyelde ortaya çıkan yükseltgenme piki ile çalışmalar benimsenmiştir.

Şekil 4.4 te 2 mM H_2O_2 ye ait, PtE ile en büyük akım değerlerinin elde edildiği, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde elde edilen CV gösterilmiştir.



Şekil 4.4. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, 2 mM H_2O_2 için, PtE ile elde edilen CV ler

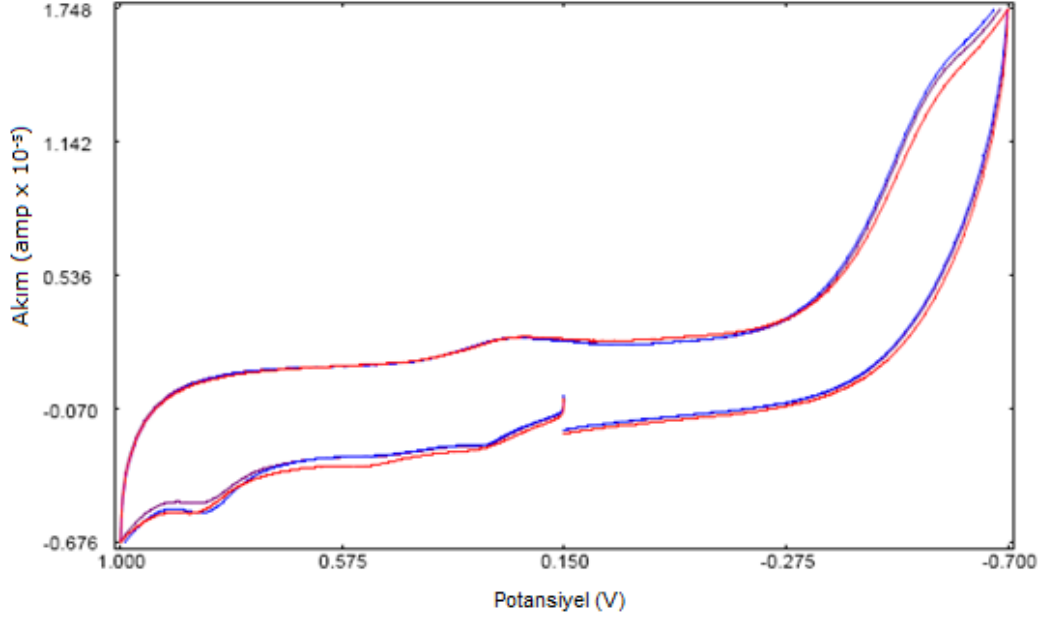
2 mM H_2O_2 ye ait, **zemin** e ait

H_2O_2 için, PtE ile yapılan çalışmaların ardından, aynı çözelti koşullarında, GE ve GCE larda, H_2O_2 ye ait akım değişimi gözlenip gözlenmeyeceği incelendi.

4.1.1.2. H_2O_2 için GE yapılan çalışmalar

H_2O_2 için, elde hazırlanmış, waks empegre edilmiş, yaklaşık 3 mm çaplı GE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, zemin ve 2 mM H_2O_2 içeren çözeltilere ait çevrimsel

voltametri yöntemi ile çalışma yapılarak, H₂O₂'nin bu deneysel şartlarda elektroaktif olup olmadığı incelendi. Elde edilen voltamogramlar, Şekil 4.5. de gösterilmiştir.

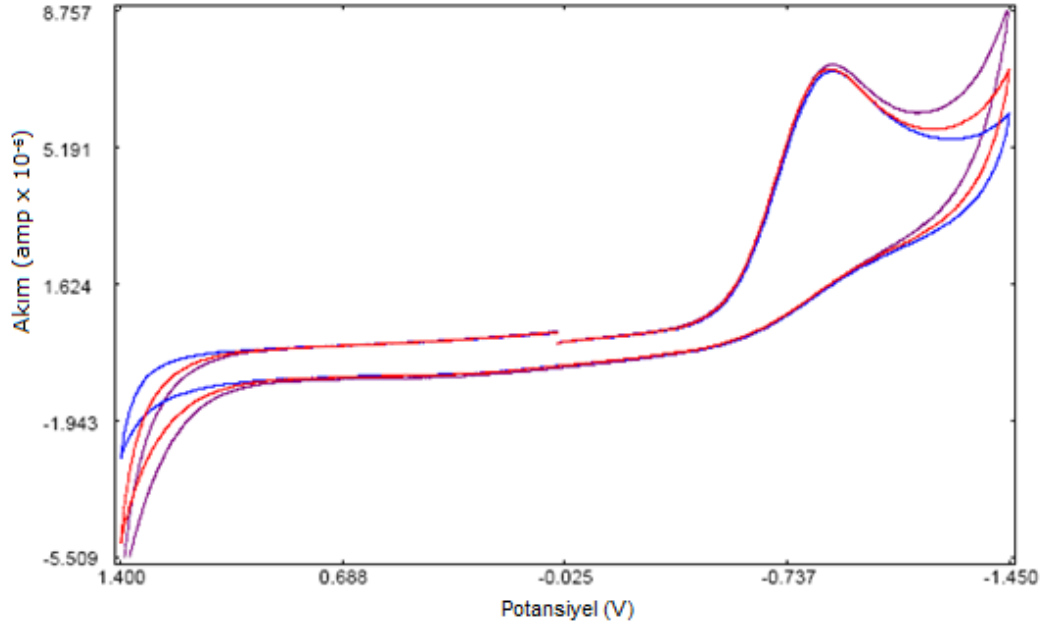


Şekil 4.5. GE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde H₂O₂'ye ait CV' ler
Zemine ait, 1 mM H₂O₂ ye ait, 2 mM H₂O₂ ye ait

Elde edilen voltamogramlar incelendiğinde, GE ile H₂O₂ için anodik veya katodik herhangi bir pik ya da akım bölgesi gözlenmediği için GE denemelerine daha ileri çalışmalarda yer verilmemiştir.

4.1.1.3. H₂O₂ için GCE yapılan çalışmalar

GCE'de, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, 1 ve 2 mM H₂O₂ ve zemine ait için CV' ler alındı.



Şekil 4.6. GCE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde H_2O_2 ye ait CV ler
Zemine ait, 1 mM H_2O_2 ye ait, 2 mM H_2O_2 ye ait

GCE ile H_2O_2 varlığında elde edilen voltamogramlar incelendiğinde, GCE üzerinde, H_2O_2 varlığından bağımsız olarak -850 mV da ortaya çıkan katodik akım bölgesinin H_2O_2 eklenmesinden sonrada değişmediği görüldü

H_2O_2 analizi için farklı elektrolit ve farklı elektrotlarla LSV ve CV yöntemleri ile yapılan optimizasyon çalışmalarında, H_2O_2 ye ait en uygun pikler, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde Pt ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir.

Gerek H_2O_2 için yapılan çalışmaların sonuçlarından, gerekse, analizlenmeye çalışılan VA-VAD çiftinin mediatör olarak görev yaptığı, lignin peroksidaz enzimine ait enzimatik süreç ile ilgili, literatürde var olan çalışmaların, pH 2-4 gibi asidik pH'lerde yapılmış olmasından ve lignin peroksidaz enzimin asidik pH lerde daha iyi çalışmasından dolayı, çalışmamızın ilerleyen kısımları için genel olarak asidik pH lerde tartarat tamponu kullanılması kararlaştırıldı.

4.1.2. VA ile ilgili çalışmalar

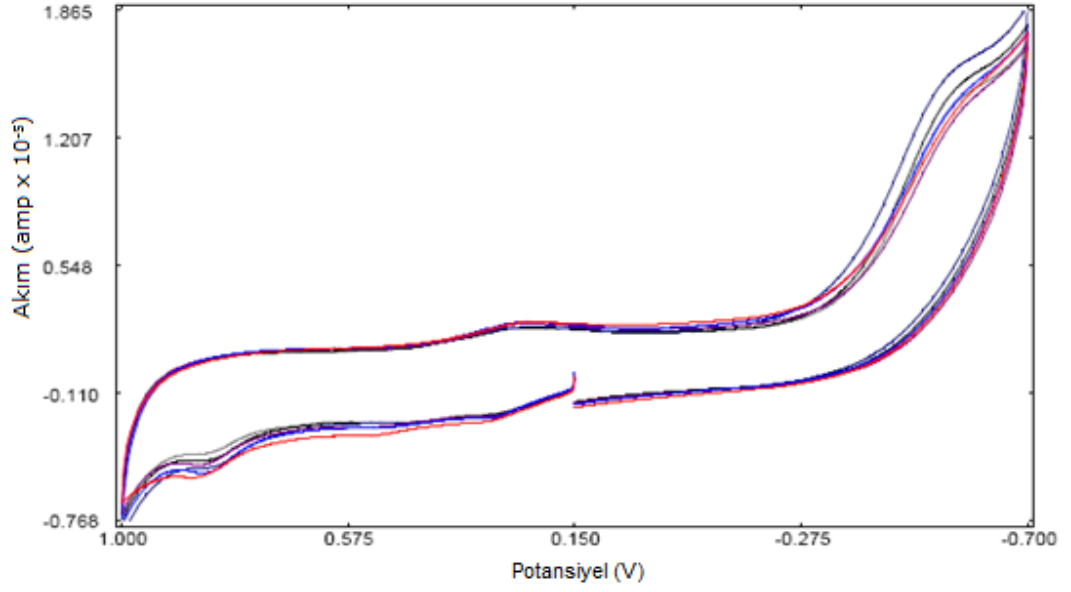
VA, lignin peroksidaz enziminin lignini parçalaması ile ilgili reaksiyon sürecinde mediatör olarak kullanılır. Enzimatik reaksiyon gerçekleşirken, VA elektron vererek VAD e dönüşür. Böylece, enzimatik süreçte reaksiyon boyunca VA' ün yükseltgenip VAD oluşturması ile ortamdaki VA miktarı azalır. Bu nedenle, lignin miktarı ile ilgili analizlerde ve lignin peroksidaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalarda, VA miktarındaki azalmasının incelenmesinden yararlanılabilir.

Bu nedenle, çalışmamızda VA'yı voltametrik yöntemlerle analizleyebilmek için çeşitli denemeler yapılmış ve daha hassas analizler için en yüksek pik akımına sahip, en kullanışlı, en uygun pikleri elde edebilmek amacıyla, çalışma elektrodu, çalışma çözeltisi, çözelti pH si gibi optimizasyonlar yapılmaya çalışılmıştır.

Bu amaçla GE, PtE ve GCE ile farklı pH lerdeki farklı çözeltiler ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

4.1.2.1. VA için GE ile yapılan çalışmalar

GE ile CV yöntemi kullanarak 1 ve 2 mM VA içeren çözeltilere ait çevrimsel voltamogramlar alınarak, VA' ün grafit çalışma elektrodu ile ve pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde elektroaktif olup olmadığı incelendi.



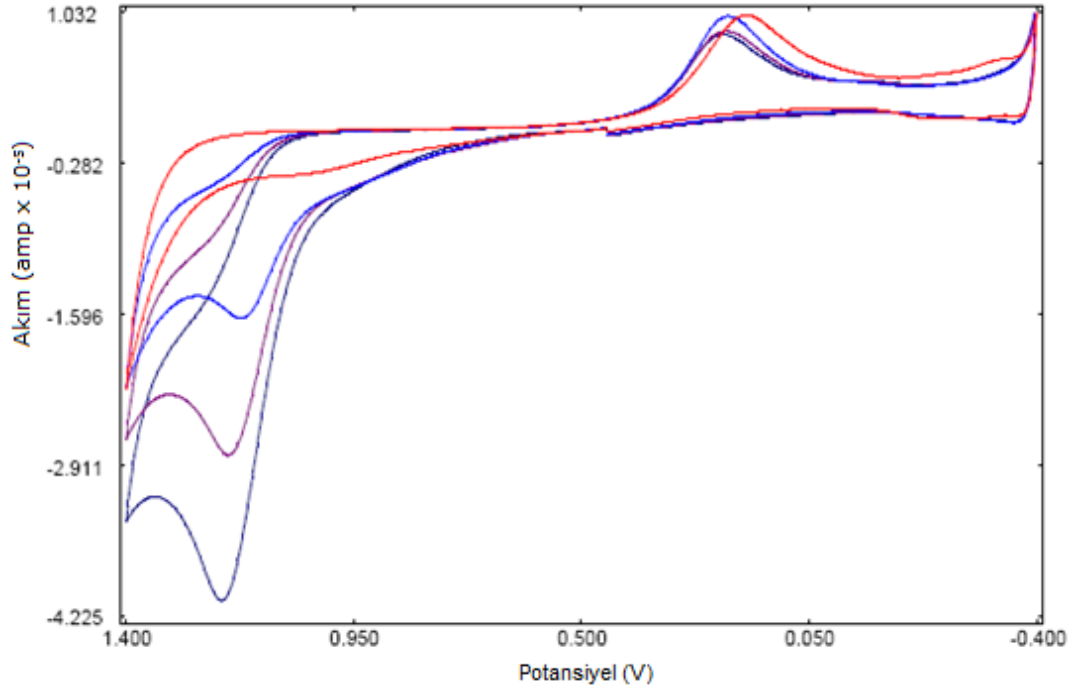
Şekil 4.7. GE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde H_2O_2 ye ait CV ler
Zemine ait, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM VA' e ait

Şekil 4.7. da görüldüğü gibi, 1 mM dan 5 mM a kadar VA içeren çözeltilere ait CV ları VA içermeyen zemine ait CV ile karşılaştırdığımızda VA' ün GE üzerinde herhangi bir elektro aktivite göstermemiştir.

4.1.2.2. VA için PtE ile yapılan çalışmalar

GE ile herhangi bir sonuç alınamamasının ardından, çalışmaya H_2O_2 için en uygun piklerin elde edildiği çalışma elektrodu olan PtE ile denemeler yapıldı.

PtE ile içerisinde H_2O_2 için en uygun piklerin elde edildiği çalışma çözeltisi olarak seçilen pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde çalışmaya başlandı. 2, 4 ve 6 mM VA içeren çözeltilere ait çevrimsel voltamogramlar alınarak, zemine ait voltamogramla karşılaştırıldı ve VA' ün bu koşullarda elektroaktif davranıp davranmadığı incelendi.



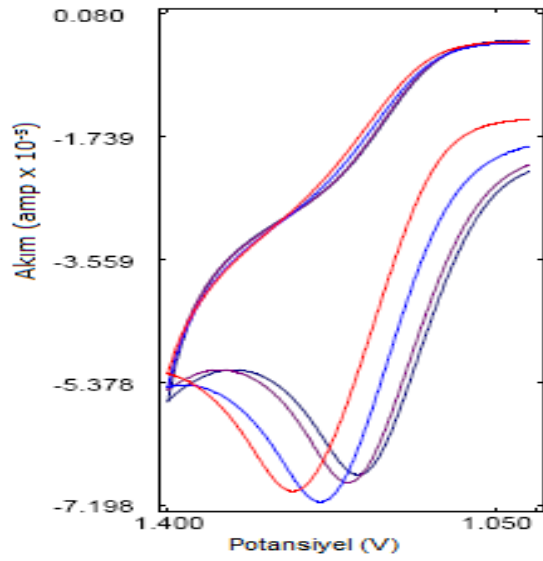
Şekil 4.8. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde platin elektrot ile VA' e ait CV ler **Zemine**, **2 mM VA**, **4 mM VA** ve **6 mM VA**' e ait

Şekil 4.8. deki çevrimsel voltamogramlar incelendiğinde, zemine ait CV da var olmayıp, VA eklenmesi ile ortaya çıkan ve VA konsantrasyonundaki artış ile akım büyüklüğü doğrusal bir artış gösteren, +1200 mV potansiyel civarındaki yükseltgenme piki veratril alkol eklenmesi ile hafifçe daha anodik bölgeye kaymaktadır.

a) Tartarat tamponu pH sinin değişiminin VA pikine etkisi:

VA için belirgin bir pik elde edilmesinin ardından, elde edilen bu pikin, kullanılan tampon çözeltinin pH sinin biraz daha asidik ve biraz daha bazik bölgeye kaydırılması sonucu, piklerdeki değişimi incelemek amacı ile pH 3, 3,5, 4,0, 4,5 tartarat tamponları içerisinde, 2 mM VA e ait çevrimsel voltamogramlar alındı ve sonuçlar şekil 2.1.9 da gösterilmiştir.

10 mM veratril alkolün farklı pH lerde hazırlanmış tartarat tamponlarında verdiği anodik pikler karşılaştırıldığında, çözelti pH sinin artması ile pikin yerinin daha düşük potansiyellere kaydığı ve aynı konsantrasyon daki çözeltiler için, en yüksek pik akıma sahip pikin, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde elde edildiği görülmüştür ve bu çözelti zemin çalışma eğrileri nin elde edildiği temel elektrolit olarak seçilmiştir.



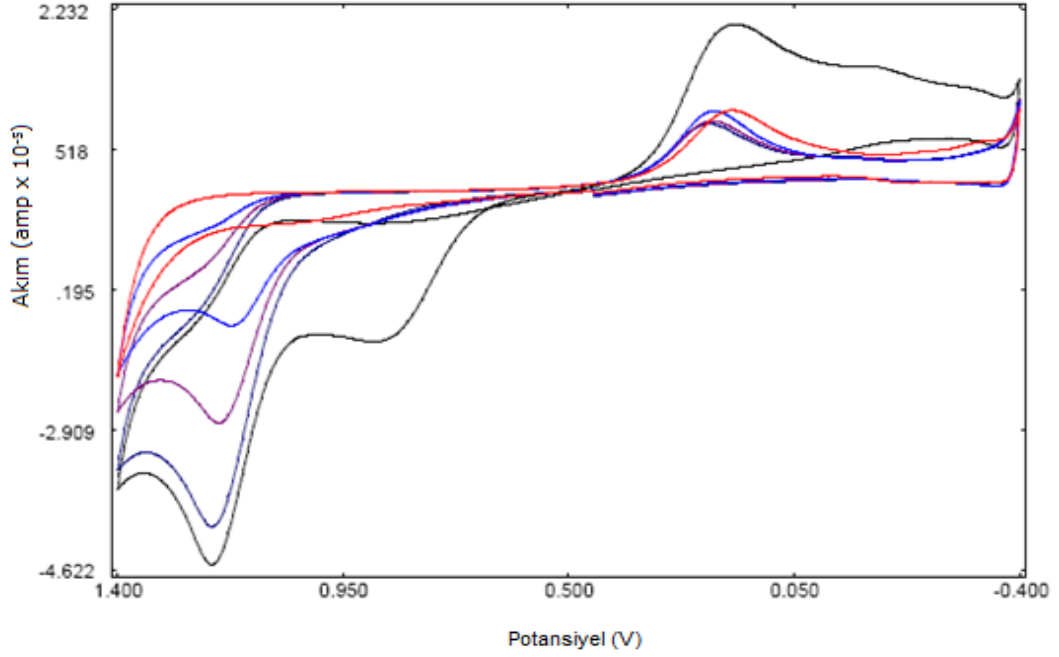
Şekil 4.9. PtE ile farklı pH deki tartarat tamponları içinde VA e ait CV ler

pH 3 tartarat, pH 3,5 tartarat, pH 4,0 tartarat ve pH 4,5 tartarat tamponları içerisinde, 10 mM VA' e ait

VA için, pH 3,5 tartarat tamponunun akım büyüklüğünün en iyi olduğunun görülmesinin ardından, bu pik üzerine çeşitli etkilerin etkisini inceleme ve bu pikin daha iyi, daha yüksek pik akımına sahip hale getirilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

b) VA CV piki üzerine, H₂O₂ nin etkisi:

pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, +1200 mV potansiyelde elde edilen yükseltgenme piki üzerine, analiz ortamında bulunması muhtemel olan H₂O₂'nin etkisini incelemek amacı ile 6 mM VA içeren çözelti üzerine, 2 mM H₂O₂ eklenerek H₂O₂ nin voltamogram üzerindeki etkisi incelendi.



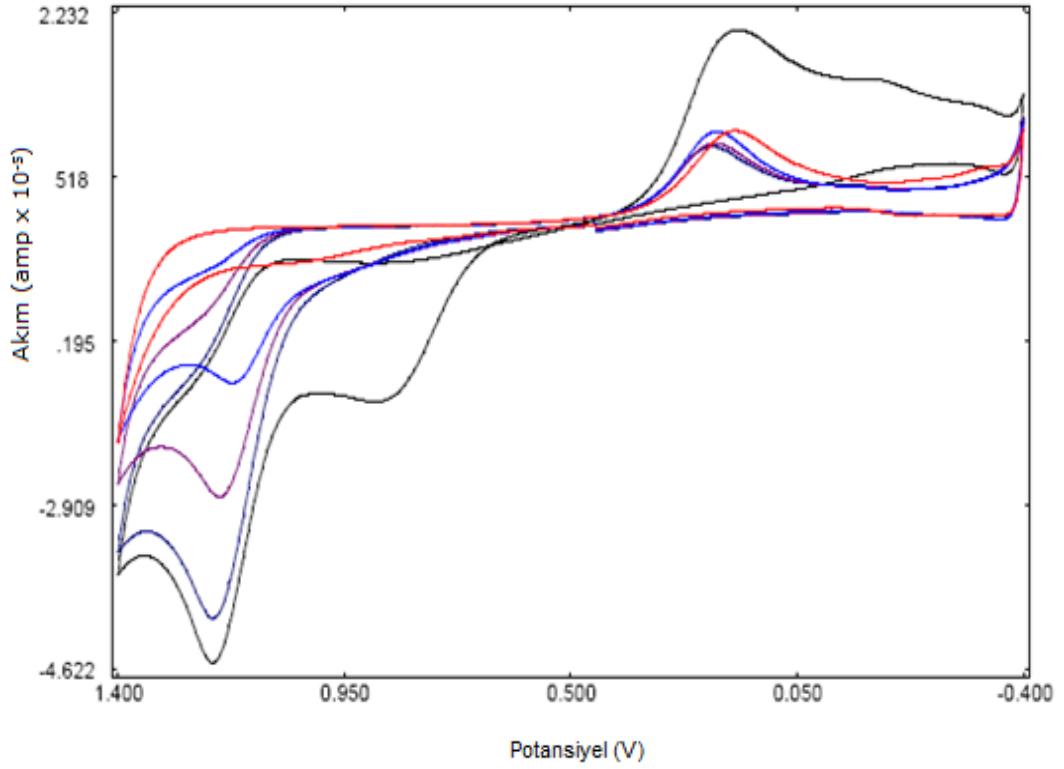
Şekil 4.10. Pt elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde VA' e ait CV ler

Zemine ait, 2 mM VA ait, 4 mM VA e ait, 6 mM VA e ait ve 6 mM VA + 2 mM H₂O₂ e ait

Şekil 4.10'da ki CV lar incelendiğinde, H₂O₂'nin VA piki üzerinde bir miktar artırıcı etki yaptığı görüldü. Ayrıca, +200 mV potansiyel civarında zeminde de bir akım büyüme bölgesi olarak görülen yükseltgenme bölgesinde belirgin bir artış görüldü.

c) VA' ün H₂O₂ e ait pik üzerine etkisi:

H₂O₂'nin VA pikini artırıcı etki yapması üzerine, VA'nın H₂O₂ ye ait +800 mV potansiyelde gözlenen pikine herhangi bir etki yapıp yapmadığını incelemek için, 2 mM H₂O₂ içeren çözelti üzerine, 2, 4, 6, 8, 10 mM VA eklenerek CV ları alındı. CV'ler Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Pt elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda VA çözeltilerine ait CV ler

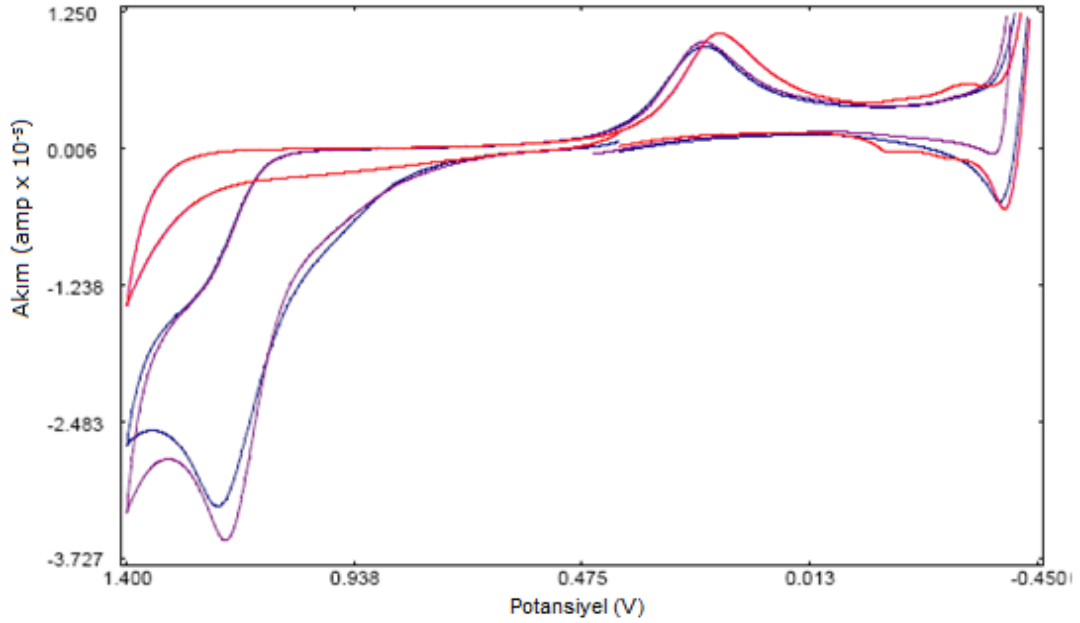
Zemine ait, 2mM H₂O₂ e ait, 2 mM H₂O₂ üzerine, 2 mM veratril alkol, 4 mM veratril alkol, 6 mM veratril alkol

Pikler incelendiğinde, +800 mV potansiyel civarında ortaya çıkan H₂O₂'ye ait pik akımında VA eklenmesi ile az miktarda azalma ve pozitif potansiyellere kayma gözlemlendi. +200 mV civarında zemine de var olan indirgenme piki, H₂O₂ eklenmesi ile belirgin şekilde artış gösteren pikte VA eklenmesi ile az miktarda azalma gözlemlendi. VA için gözlenen +1200 mV potansiyeldeki yükseltgenme pikinde ise artan VA konsantrasyonu ile düzenli bir artış gözlemlendi.

d) Tartarat ve Britton-Robinson tamponlarının karşılaştırılması:

Tartarat tamponu için, asidik pH lerde pH optimizasyonu yapıp en uygun pH nin 3,5 olduğu görüldükten sonra, aynı pH de Britton-Robinson tamponu içerisinde de VA için pik elde edilip edilemeyeceği incelendi. VA için, Britton-Robinson, tamponunda da, tartarat tamponundaki pik ile neredeyse aynı potansiyelde bir yükseltgenme piki gözlemlenmiştir. Elde edilen bu piki tartarat tamponu içerisinde elde edilen pikle

karşılaştırmak için her iki tamponun 6 mM VA içeren çözeltilerine ait çevrimsel voltamogramlar alındı. Elde edilen CV'ler Şekil 4.12'te gösterilmiştir.



Şekil 4.12. PtE ile VA piki için, tartarat ve Britton-Robinson tamponlarının karşılaştırılması

Zemine ait CV, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, 6 mM VA e ait CV, pH 3,5 Britton-Robinson içerisinde 6 mM VA e ait CV

Şekil 2.1.12. deki CV'ler incelendiğinde, tartarat tamponu içerisinde elde edilen pikin akım büyüklüğünün daha fazla olduğu ve analizler için daha kullanışlı olduğu görüldü.

Böylece, VA çalışması için pH ve tampon çözelti, optimizasyonu yapılmış ve pH 3,5 tartarat tamponu olarak seçilmiş oldu.

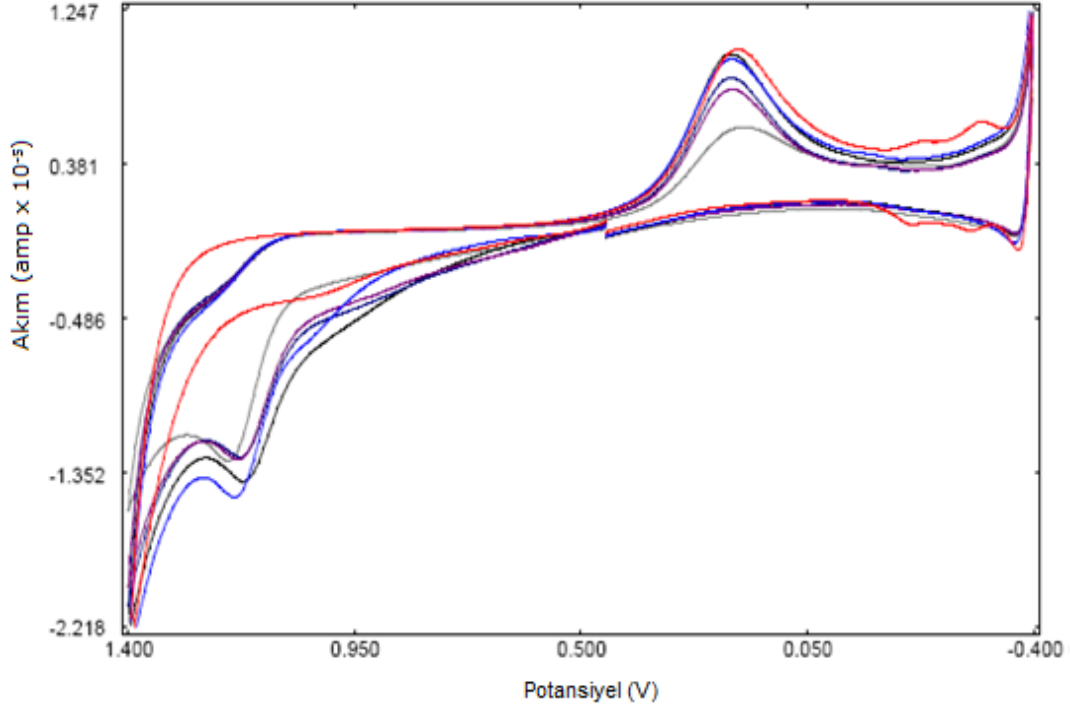
Bu çözelti şartlarında, PtE ile elde edilen bu piki daha iyi hale getirmek amacı ile bazı çalışmalar yapılmıştır.

e) Elektrodun çalışma öncesi belli potansiyellerde bekletilmesinin piklerdeki etkisi:

Çalışma yapılmadan önce, elektrodun 2 dakika gibi bir süre belli bir potansiyelde bekletilerek, analizlenecek maddenin elektrot üzerinde biriktirilmesi ve ardından çalışma yapılmasının, pikler üzerinde iyileştirici etki yapıp yapmayacağı incelendi.

Bu amaçla, Pt çalışma elektrodu çalışma öncesinde -500, -400, -300, -200, -100, +100, +200, +300, +400, +500 mV potansiyellerde 2 dakika süreyle bekletilip çalışma elektrodunun izin verdiği potansiyel aralığında 2 mM VA içeren çözeltilere ait CV lar

alındı. Elde edilen pikler ile elektroda herhangi bir işlem yapılmadan elde edilen CV ler karşılaştırıldı.



Şekil 4.13. PtE'nin analiz öncesi çeşitli potansiyellerde bekletilmesinin etkisi

Herhangi bir bekletme işlemi yapılmaksızın, +100 mV potansiyelde iki dakika bekletilmesinin ardından, +500 mV potansiyelde iki dakika bekletilmesinin ardından, -100 mV potansiyelde iki dakika bekletilmesinin ardından ve -500 mV potansiyelde iki dakika bekletilmesinin ardından, 2 mM VA için elde edile CV'ler, zemine ait CV

Elde edilen pikler incelendiğinde, elektrodun analiz öncesi çeşitli potansiyellerde bekletilmesi sonrası CV alınması ile yapılan çalışmalarda, elektrot üzerinde herhangi bir ön birikime bağlı olumlu etkinin gözlenmediği, aksine pik akımı değerlerinde bağlı olarak bir azalma meydana geldiği belirlenmiştir.

f) Puls teknikleri kullanarak potansiyel tarama yapılmasının veratril alkol piklerine etkisi:

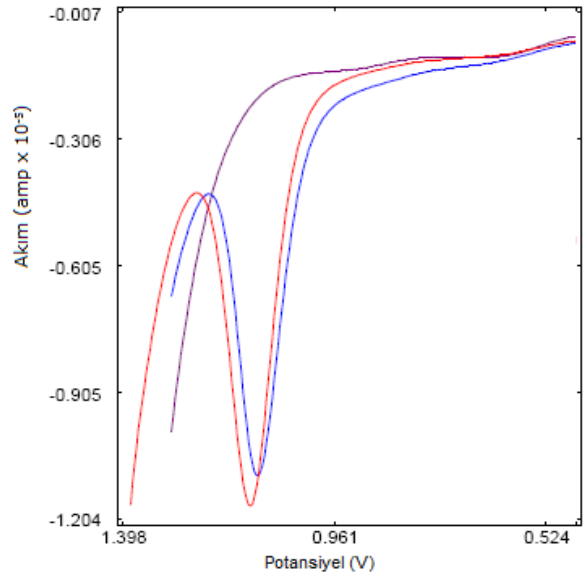
PtE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde CV, LSV yöntemleri ile elde edilen VA e ait pikleri daha belirgin, analizler için daha kullanışlı hale getirebilmek amacıyla, puls tekniklerinin etkisi incelendi.

g) PtE ile DPV uygulamaları:

Puls teknikleri ile yapılan uygulamalarda ilk olarak, CV ile elde edilen piklerin DPV yöntemi ile daha iyi hale gelip gelmeyeceğini incelemek amacı ile 2 mM VA için voltamogramlar alındı. Çalışmada, 100 ms ve 200 ms lik olmak üzere 2 ayrı puls periyodu ile voltamogram alındı, hangi puls periyodu ile daha yüksek akım büyüklüğüne sahip pik elde edileceği incelendi.

CV ile +1200 mV civarında elde edilen veratril alkole ait anodik pik, DPV ile +1150 mV potansiyel civarında ortaya çıktı.

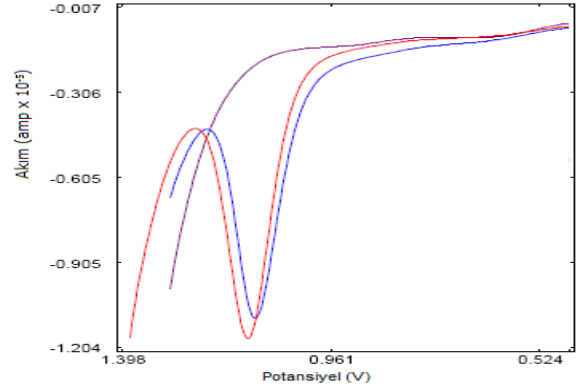
Puls periyodunun 100 ms olduğu çalışmada daha yüksek akım büyüklüğüne sahip pik elde edildi. DPV ile, katodik yönde yapılan çalışmada da, +1200 mV potansiyelde veratril alkole ait bir indirgenme piki gözlemlendi. Ancak anodik yönde elde edilen pikin akım büyüklüğü katodik yöndekinden daha büyük olduğundan, katodik yönde elde edilen pik ile sistematik bir çalışma yapılması gerekli görülmedi.



Şekil 4.14. Pt elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, puls periyodu değişiminin DPV'ler üzerindeki etkisi

Zemine ait, 2 mM veratril alkole ait, 100 ms puls periyodunda elde edilen, 200 ms puls periyodunda elde edilen, anodik DPV'leri

Yapılan DPV çalışması ile, veratril alkol için elde edilen anodik yöndeki pik, aynı deneysel şartlarda CV yöntemi ile elde edilen anodik yöndeki pike göre, analizlerde kullanılabilmek için daha belirgin hale geldi. Ancak, DPV de elde edilen pikin akım büyüklüğü, beklendiği şekilde CV ile elde edilene göre yüksek değil, yaklaşık olarak aynı büyüklükte ortaya çıktı.



Şekil 4.15. Pt elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde DPV ve CV ile elde edilen piklerin karşılaştırılması

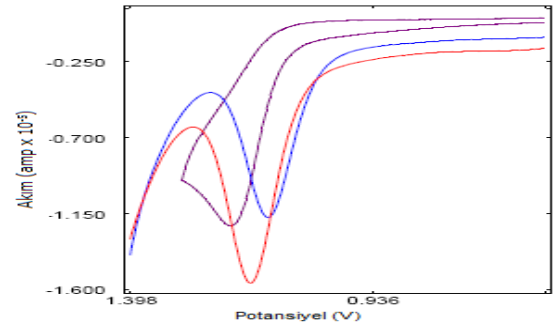
2 mM veratril alkol için, **DPV ile elde edilen pik, CV ile elde edilen pik**

h) PtE ile SWV uygulamaları:

DPV ile elde edilen piklerin akımlarının, istediğimiz büyüklükte olmamasından dolayı, daha büyük akım büyüklüğüne sahip pikler elde edebilmek amacıyla, farklı bir potansiyel uygulama programına sahip olan kare SWV yöntem ile de deneyler yapıldı.

SWV yöntemi ile de, CV ve DPV de elde edilen piklerle yaklaşık olarak aynı potansiyellerde daha büyük pik akımı değerleri elde edildi.

CV ve DPV ye göre daha yüksek akım büyüklüklerine sahip pik ler elde edebilmek amacı ile yapılan SWV yöntemi ile elde edilen pikler ile CV ve DPV elde edilen piklerin karşılaştırılması Şekil 4.16. da gösterilmiştir. Beklen-diği gibi SWV yönteminde daha belirgin ve daha büyük pik akımına sahip pikler elde edilmiştir.



Şekil 4.16. Pt elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde SWV, DPV ve CV ile elde edilen piklerin karşılaştırılması

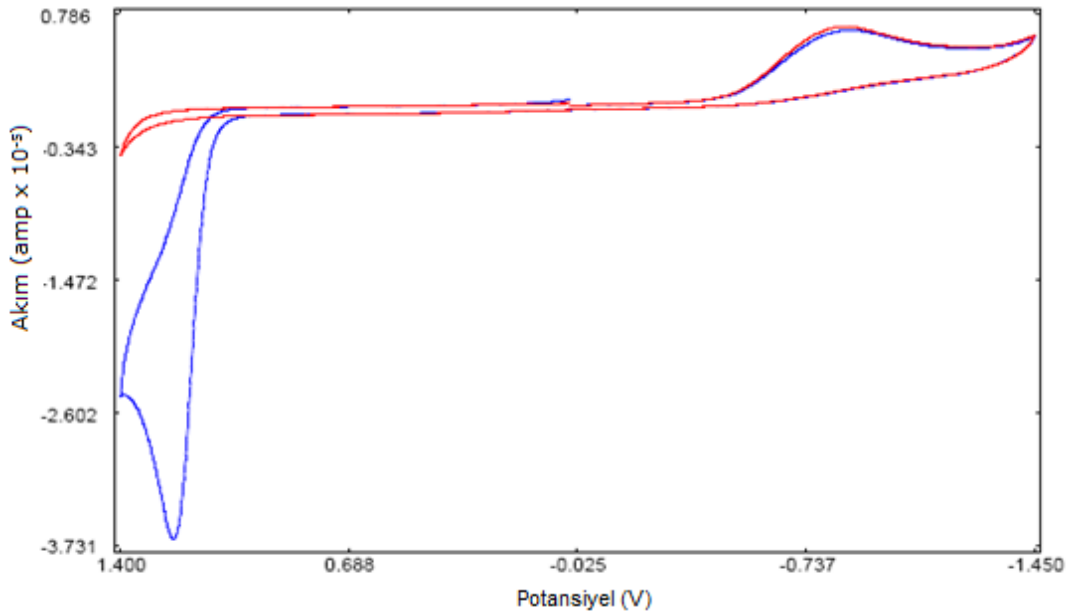
2 mM veratril alkol için, **CV ile elde edilen, DPV ile elde edilen ve SWV ile elde edilen**

Böylece, PtE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, VA için, çeşitli voltametrik yöntemler kullanarak, akım büyüklüğü en yüksek, analizlerde en hassas sonuçlar verebilecek en kullanışlı piki SWV yöntemi ile elde edildi. PtE için, çalışma çözeltisi, çözelti pH si ve voltametrik yöntem optimizasyonu yapılmış oldu.

4.1.2.3. VA için GCE ile yapılan çalışmalar

PtE ile çeşitli optimizasyonların yapılarak en uygun şartların belirlenmesinin ardından, VA için GCE ile analiz için kullanılacak herhangi bir pik elde edilemeyeceğini görmek amacı ile bazı çalışmalar yapıldı.

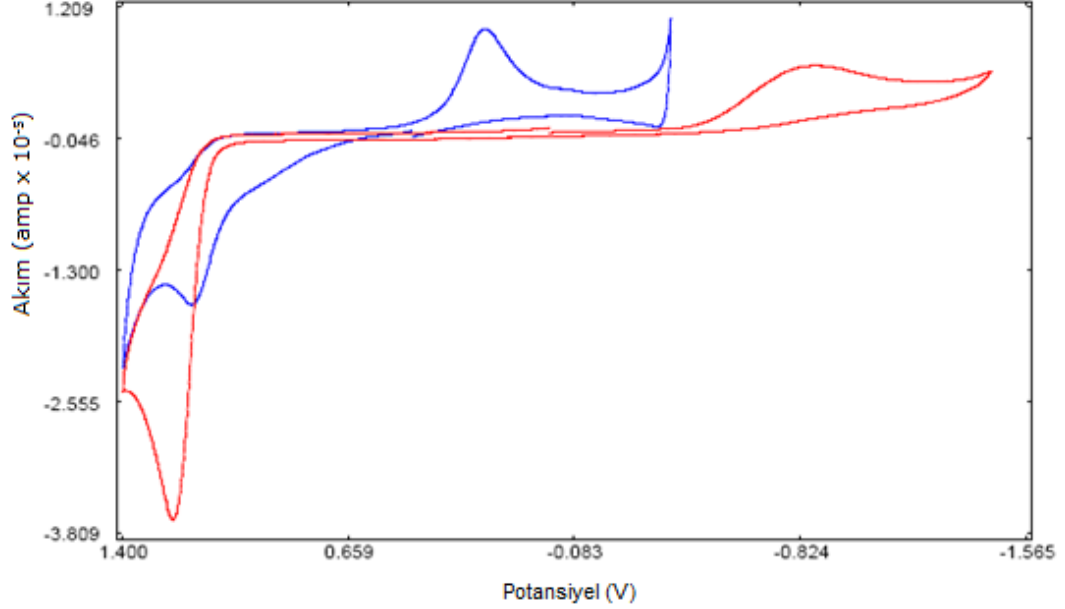
Bu amaçla öncelikle, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, 2 mM VA için çevrimsel voltamogram alınarak, VA' ün GCE üzerinde elektroaktif olarak davranıp davranmadığı incelendi.



Şekil 4.17. Camı karbon elektrot ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde VA' e ait CV **Zemine ait CV**, **2 mM veratril alkol içeren çözeltiye ait CV**

2 mM VA için GCE ile elde edilen CV incelendiğinde, katodik bölgede zeminden farklı olarak herhangi bir pik veya akım büyümesi gözlenmezken, anodik bölgede

+1250 mV potansiyel civarında çok belirgin, yüksek akım büyüklüğüne sahip bir pik gözlemlendi.



Şekil 4.18. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde GCE ve Pt ile elde edilen CV ler
GCE ile 2 mM VA için elde edilen CV, Pt ile 2 mM VA için elde edilen CV

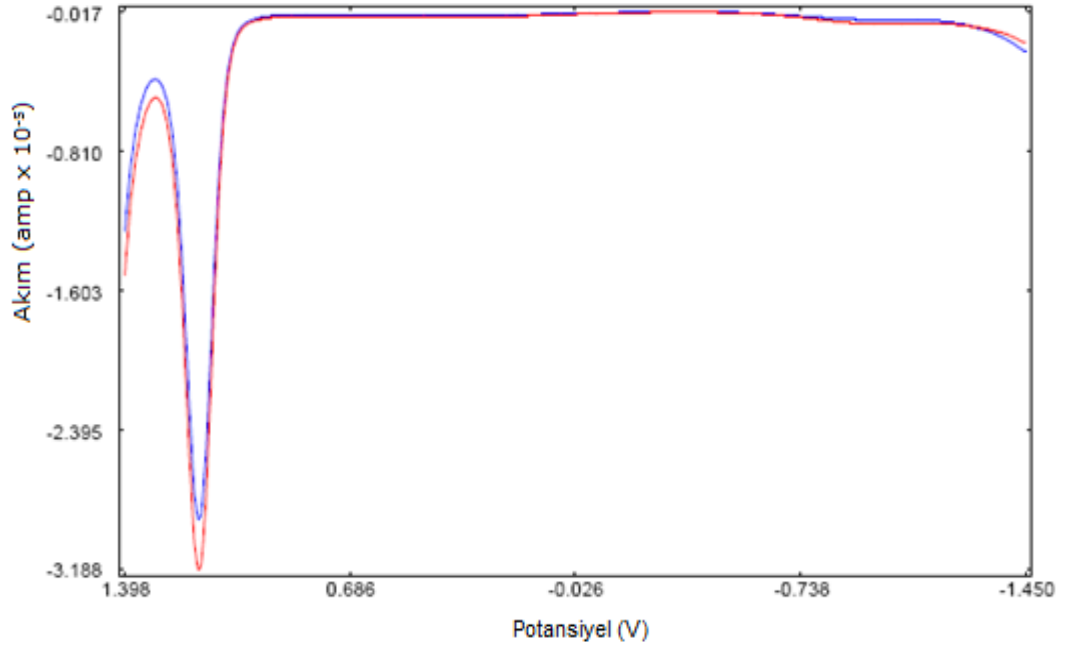
Şekil 4.18'deki, pikler incelendiğinde, GCE ile elde edilen pikin, PtE ile aynı konsantrasyondaki VA için elde edilen pikden çok daha yüksek pik akımına sahip olduğu görüldü.

Puls tekniklerinin, GCE üzerinde elde edilen yükseltgenme pikine etkisini görmek açısından sistematik bir çalışma gerçekleştirildi.

a) GCE ile DPV uygulamaları:

GCE ile DPV çalışmaları, PtE' ta olduğu gibi 100 ve 200 ms puls periyodu ile yapıldı.

2 mM VA için, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile 100 ve 200 ms puls periyodu ile yapılan DPV çalışmalarının sonuçları şekil 4.19 da gösterilmiştir.



Şekil 4.19. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, 2 mM VA için, GCE ile DPV yöntemi ile puls periyodu değişiminin etkisi

100 ms puls periyodu ve **200 ms puls periyodu** ile elde edilen DPV ler

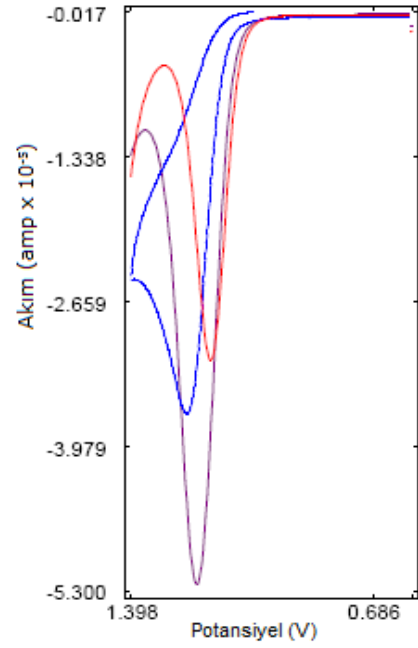
Şekil 4.19. incelendiğinde, GCE ile de PtE' ta olduğu gibi, 100 ms puls periyodunda daha yüksek akım büyüklüğüne sahip pikler elde edildiği görülmüştür. Puls periyodunun değiştirilmesinin anodik pik üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

b) GCE ile SWV uygulamaları:

PtE ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi GCE elektrotla da, DPV tekniği ile beklenen iyileşme gözlenmeyince SWV tekniği ile denemeler gerçekleştirildi.

Çalışmada 2 mM veratril alkol için SWV ile voltamogramlar alındı. Elde edilen voltamogramlar, aynı konsantrasyondaki çözeltiler için alınan DPV ve CV sonuçları ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma, Şekil 4.20. de gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi, SWV yöntemi ile elde edilen pikin akımlarının, diğer yöntemlerle elde edilen piklerin akımlarından büyük olduğu görüldü.

Böylece; SWV yöntemi ile GCE elektrot kullanılarak, veratril alkol analizi için düşük tayin limitlerinde analizler gerçekleştirmeye uygun, yeterince yüksek pik akımına sahip pikler elde edilmiş oldu.



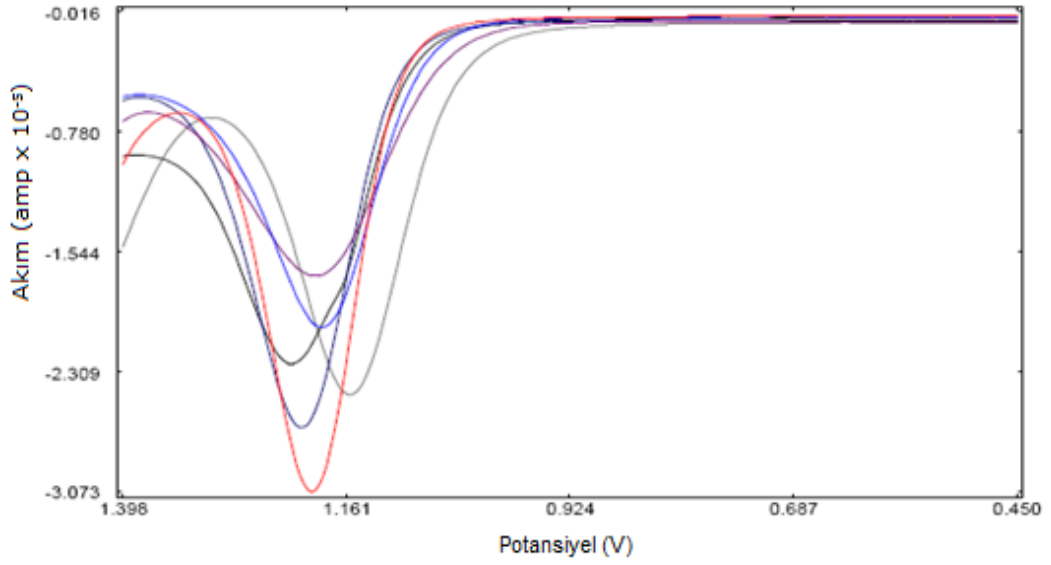
Şekil 4.20. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile SWV, DPV ve CV nin karşılaştırılması

2 mM VA için, **SWV**, **DPV** ve

c) GCE ile VA için elde edilen pike, bazik pH lerin etkisi:

pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile ve SWV yöntemi kullanılarak VA için elde edilen ve hassas analizler için uygun akım büyüklüğüne sahip pikin, bazik bölgedeki pH lerde nasıl değişim göstereceği de incelendi.

Bu amaçla, GCE ile ve SWV yöntemi kullanılarak asetat taponu ile pH 4,5 amonyak tamponu ile pH 7 ve pH 9 Britton-Robinson tamponu ile pH 7 ve pH 9'da 1 mM VA içeren çözeltiler için SWV ler alındı.



Şekil 4.21. GCE ile SWV yöntemi kullanılarak bazik pH lerdeki tamponların karşılaştırılması

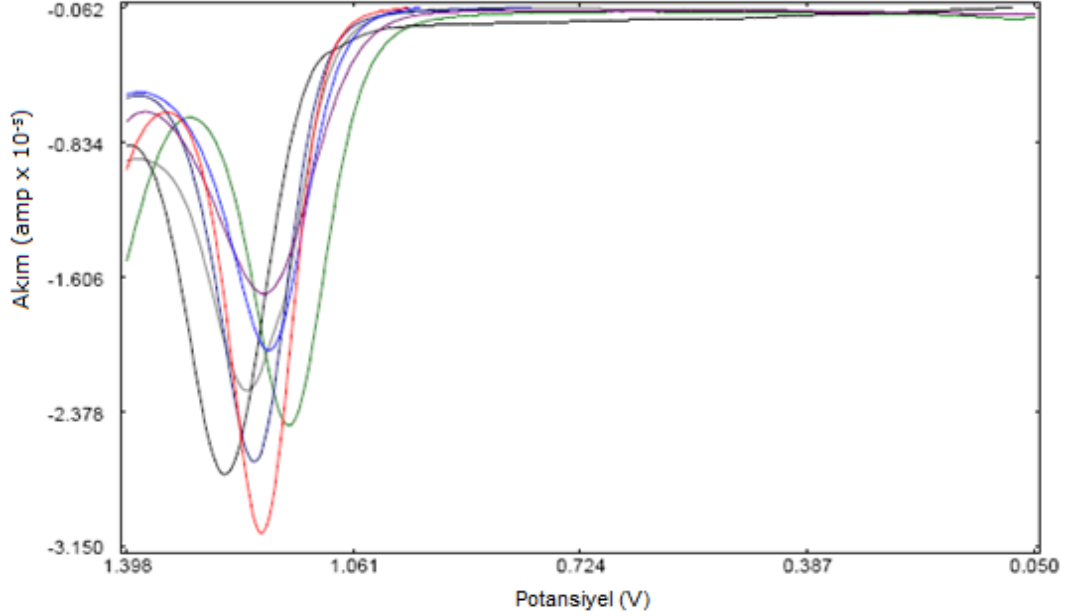
pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, pH 7,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde, pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde, pH 7,0 amonyak tamponu içerisinde, pH 9,0 amonyak tamponu içerisinde ve pH 4,5 asetat tamponu içerisinde, 1 mM VA için elde edilen SWV lar

Şekil 4.21’de gösterilen pikler incelendiğinde; genel olarak çözelti pH si arttıkça pikin akım büyüklüğü azalmaktadır. Aynı pH lerdeki amonyak ve Britton-Robinson tamponları içerisinde elde edilen piklere bakıldığında, amonyak tamponundaki piklerin daha yüksek olduğu görüldü. Elde edilen pikleri pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde elde edilen piklerle kıyasladığımızda, tartarat tamponunda elde edilen piklerin daha bazik pH lerdeki tamponlarda elde edilen piklerin hepsinden daha yüksek akım büyüklüğüne sahip olduğu görüldü. Piklerin potansiyellerine bakıldığında ise, pH arttıkça pik potansiyellerinin anodik yönden katodik yöne kaydığı görülmüştür. Böylece, analiz için 3,5 ten daha bazik bölgelerde çalışma yapmanın daha iyi sonuçlar vermediği görülmüş oldu.

c) GCE ile VA için elde edilen pike, bazik pH lerin etkisi:

Çalışma çözeltisinin pH sınırın 3,5 ten daha asidik bölgeye kayması ile pik akımının artış gösterip göstermeyeceğini incelemek amacıyla, pH 2 Britton-Robinson tamponu ile aynı elektrot ve yöntem ile 1 mM VA için çalışmalar yapıldı.

Şekil 4.22’de pH 2,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde elde edilen pikler ile bazik pH lerde ve pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde elde edilen piklerin karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 4.22. GCE ile SWV yöntemi kullanılarak farklı pH lerdeki tamponların karşılaştırılması

pH 3,5 tartarat tamponu, pH 7,0 Britton-Robinson tamponu, pH 9,0 Britton-Robinson tamponu, pH 4,5 asetat tamponu, pH 2,0 Britton-Robinson tamponu ve pH 7,0 amonyak tamponu, **pH 9,0 amonyak tamponu** içerisinde, 1 mM VA’ e ait DPV ler

pH 2 Britton-Robinson tamponu içerisinde elde edilen pik ile daha bazik pH lerdeki çözeltilerde ve pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde elde edilen pik karşılaştırıldığında, pH 2 tamponu ile elde edilen piklerin de, bazik pH lerdeki tamponlarda elde edilen pikler gibi, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde elde edilen piklerden daha düşük pik akımına sahip olduğu görüldü.

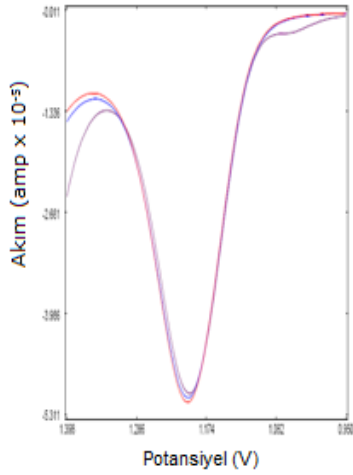
Sonuçlar incelendiğinde, VA analizi için, en uygun tampon çözelti ve pH nin, pH 3,5 tartarat tamponu olduğu ve GCE üzerinde SWV tekniği ile çalışılması halinde en yüksek duyarlılıkta çalışmaların gerçekleştirilebileceği belirlenmiş oldu.

d) VA Analizine H₂O₂ ve VAD'nin girişim etkisi:

VA için elde edilen ve optimum analiz koşulları belirlenen VA'nın elektrokimyasal reaksiyon sonucu yükseltgenmesi ile oluşan VAD molekülü ve VA'ın mediatör olarak kullanıldığı enzimatik süreçte yer alan H₂O₂ molekülü ile girişim etkileri incelendi.

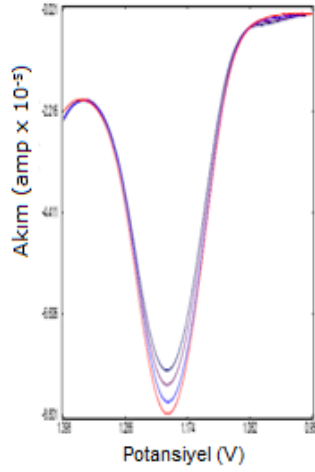
Bu amaçla, 2 mM VA içeren çözelti üzerine 3 mM H₂O₂ ve ardından 2 mM olacak şekilde VA eklenmesinin voltamogramlar üzerindeki değiştirici etkisi incelendi. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.23'te gösterildi.

VAD in sudaki çözünürlüğünün az olmasında dolayı, ancak 0,01 M gibi seyreltik çözeltiler hazırlanabildi. Dolayısıyla, çalışmalarda 1 mM VAD çözeltisi ile çalışabilmek için, 20 mL lik çalışma hücresi içerisine 2 mL VAD çözeltisi eklemek gerekmektedir. Bu ise çözelti içerisindeki diğer maddeler için önemli bir seyrelme meydana getirir. Bu nedenle, VA çözeltisi içeren çözelti üzerine VAD ekleyerek yapılan çalışmalarda VA pikinde meydana gelen azalmanın, seyrelme etkisiyle mi, yoksa VA'ın eklenen VAD ile etkileşmesi nedeniyle mi meydana geldiği incelendi. Bu amaçla, aynı konsantrasyonda VA içeren 2 çözeltilerden birine VAD diğerine ise aynı miktarlarda tampon çözelti eklenerek çalışmalar yapıldı piklerdeki değişimler incelendi.



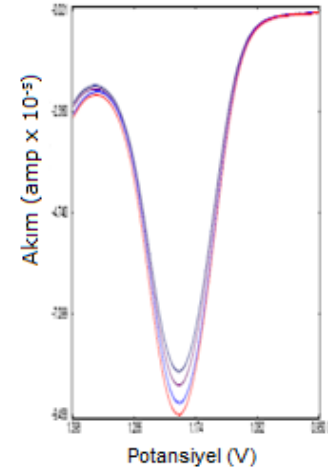
Şekil 4.23. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE elektrot ile girişim incelemesi

2 mM VA için 2 mM VA + 3 mM H₂O₂ için, 2 mM VA + 3 mM H₂O₂ + 2 mM VAD için elde edilen SWV lar



Şekil 4.24. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile VAD etkisi ile VA pikindeki azalma

3 mM VA, 3 mM VA +1 ml VAD, 3 mM VA +2 ml VAD, 3 mM VA +3 ml VAD e ait SWV lar



Şekil 4.25. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile tampon etkisi ile VA pikindeki azalma

3 mM VA, 3 mM VA + 1 ml tampon, 3 mM VA + 2 ml tampon, 3 mM VA + 3 ml tampona ait SWV lar

Şekil 4.24 ve 4.25'deki pikler incelendiğinde, veratril alkol yükseltgenme piki akımında meydana gelen küçük azalmanın seyrelmeden meydana geldiği ve VA ile VAD arasında bir reaksiyon veya etkileşme olmadığı görülmüş oldu.

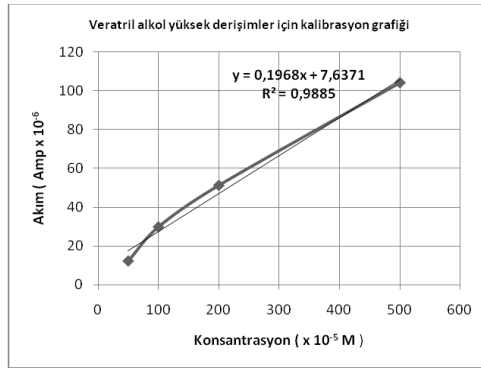
4.1.2.4. VA için kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması

VA için çalışma koşulları optimize edildi. Girişim etkileri de incelendikten sonra, yüksek ve düşük konsantrasyonlarda, çeşitli konsantrasyonlarda veratril alkol çözeltileri hazırlanıp bu çözeltilere karşılık elde edilen akım büyüklükleri bulundu. Ardında elde edilen akım büyüklüklerinin konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesi ile belirlenen yöntemin izin verdiği konsantrasyon aralığında, yüksek ve düşük konsantrasyonlar için kalibrasyon grafikleri hazırlandı.

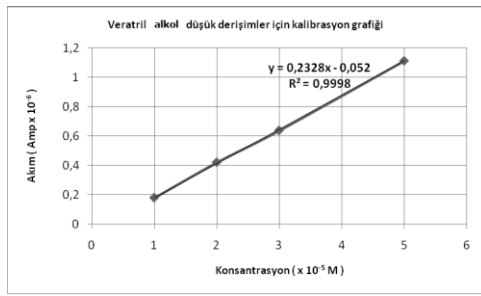
Çizelge 4.1. Veratril alkole ait, yüksek ve düşük konsantrasyonlar da hazırlanan çözeltiler için elde edilen akım büyüklükleri

Düşük konsantrasyonlar için		Yüksek konsantrasyonlar için	
Konsantrasyon (M x10 ⁻⁵)	Akım (amp x 10 ⁻⁶)	Konsantrasyon (M x10 ⁻⁵)	Akım (amp x 10 ⁻⁶)
1	0,179	50	12,3
2	0,471	100	29,9
3	0,639	200	51,31
5	0,826	500	104,3

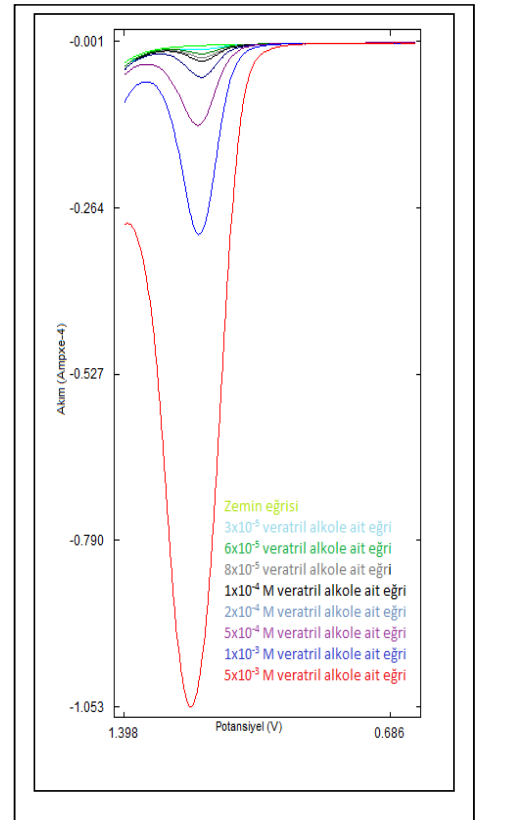
Çizelge 4.1’de gösterilen, veratril alkole ait yüksek ve düşük konsantrasyonlarda çözeltiler için elde edilen akım büyüklüklerinden yararlanarak kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır.



Şekil 4.26. VA yüksek derişimler için kalibrasyon grafiği



Şekil 4.27. VA düşük derişimler için kalibrasyon grafiği



Şekil 4.28. VA için, optimizasyonu yapılan şartlarda elde edilen derişim-akım eğrileri

VA için $1-10 \times 10^{-5}$ M düşük konsantrasyon aralığında ve $0,5 - 5 \times 10^{-3}$ M yüksek konsantrasyon aralığında ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri hazırlandı.

VA için, 10^{-5} M gibi düşük konsantrasyonlardan 10^{-3} M konsantrasyonlar arasında kalibrasyon grafikler hazırlandı. Gerek düşük, gerekse yüksek konsantrasyonlarda doğrusal, analizler için uygun grafikler elde edildi.

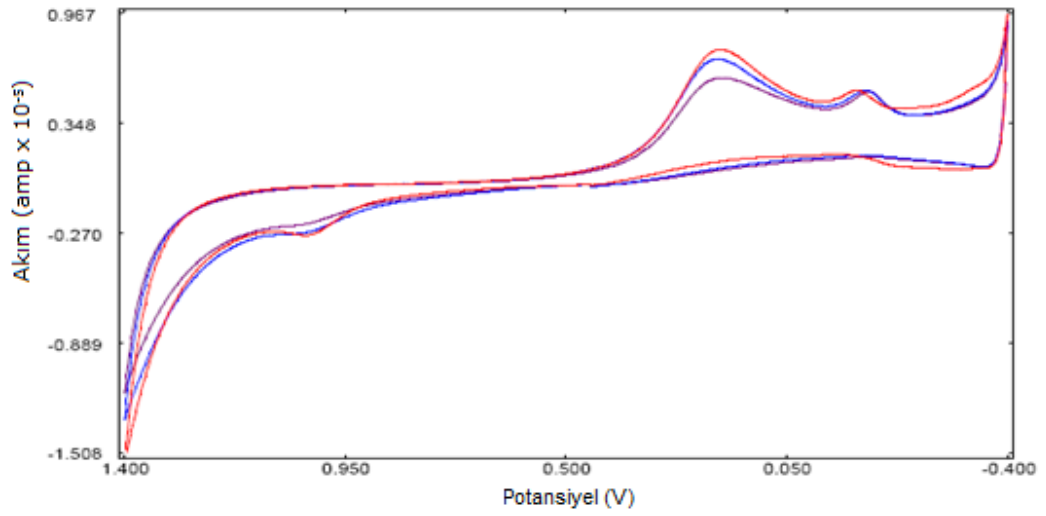
4.1.3. VAD ile yapılan çalışmalar

VAD, VA'nın yükseltgenmesi sonucu oluşan moleküldür. Lignin peroksidaz enziminin lignini parçalaması ile ilgili reaksiyon sürecinde, mediatör olarak kullanılan bu redoks çifti elektron alış verişi yaparak birbirine dönüşür. Böylece, enzimatik süreçte, reaksiyon boyunca, VA'ın yükseltgenip VAD oluşturması ile ortamdaki VA miktarı azalırken, bununla orantılı olarak VAD miktarı da artar. Bu nedenle, lignin miktarı ile ilgili analizlerde ve lignin peroksidaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalarda, VA miktarının azalmasının incelenmesinin yanı sıra, VAD miktarındaki artışın incelenmesi de alternatif bir yöntem olabileceği değerlendirilmiştir.

4.1.3.1 VAD için PtE ile yapılan çalışmalar

VAD ile çalışmaya ilk olarak, VA için en uygun çözelti ortamında ve çalışma elektrodu olarak platin çalışma elektrodu ile başlandı.

pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, PtE ile VAD içermeyen, 0,5 mM VAD içeren ve 1 mM VAD içeren çözeltilere ait çevrimsel voltamogramlar alındı.

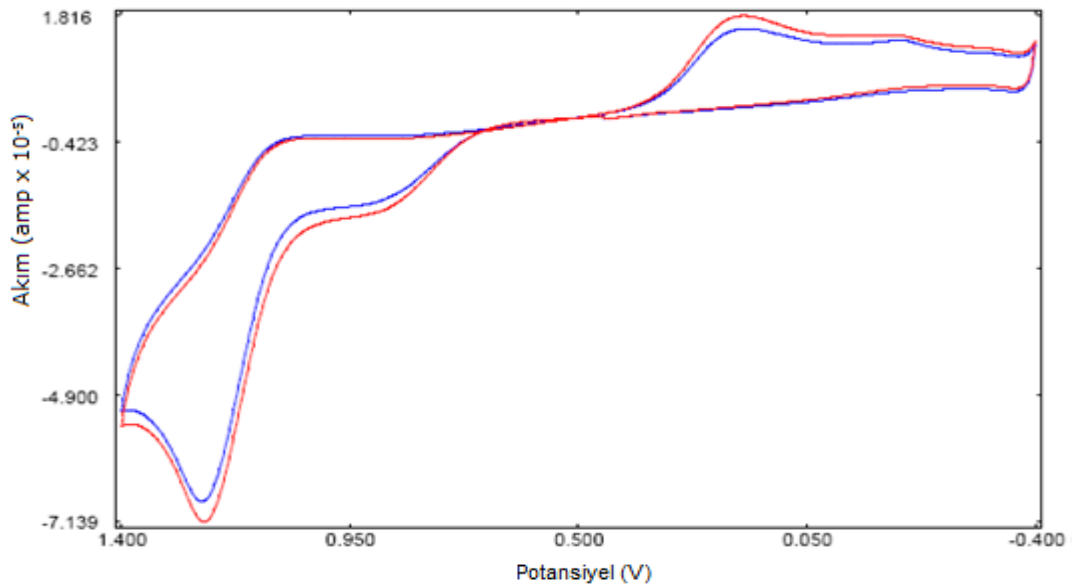


Şekil 4.29. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, Pt elektrot ile VAD için elde edilen CV ler

Zemine ait, 0,5 mM VAD içeren çözeltiye ait, 1 mM VAD içeren çözeltiye ait

Şekil 4.29 deki pikler incelendiğinde, VAD'e ait herhangi bir akım bölgesi veya pik elde edilemediği görüldü.

Ardından, aynı tampon içerisinde VA ve H₂O₂ içeren çözelti üzerine, VAD ekleyerek çevrimsel voltamogram alındı ve piklerdeki değişimler incelendi.



Şekil 4.30. PtE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, VA piki üzerine VAD etkisi **1 mM VA, 1 mM VA+1 mM VAD** içeren çözeltiye ait CV' ler

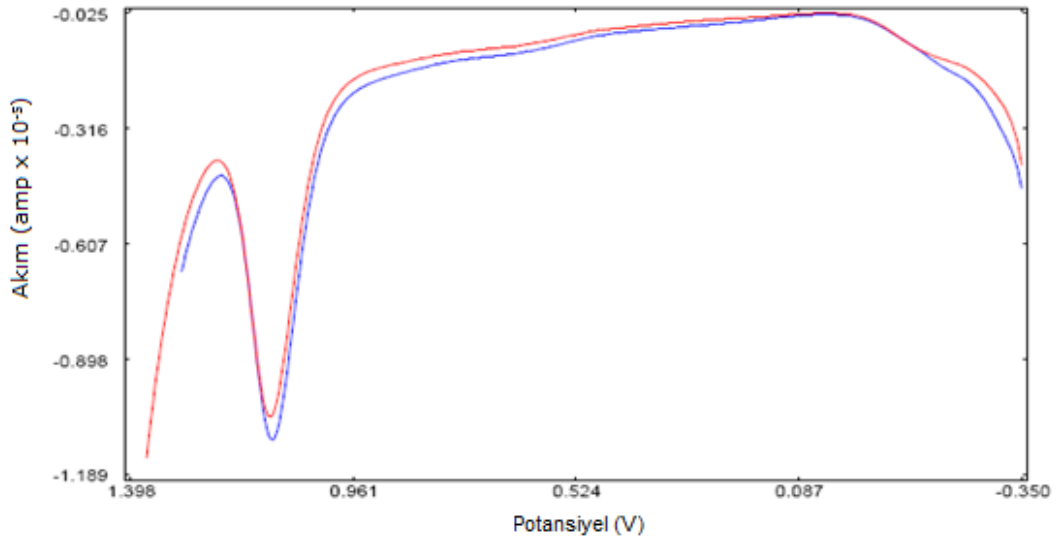
Elde edilen CV ler incelendiğinde, VA üzerine VAD eklenmesi ile piklerde bir değişim gözlenmedi. Tüm piklerde genel olarak, konsantrasyon azalmasından dolayı, küçülme meydana geldiği görüldü.

Tartarat tamponunun pH sini 3,5 ten 3,0 a indirdiğimizde ve 4,5 e çıkardığımızda da, VAD e ait herhangi bir akım büyümesi görülmedi.

a) VAD için PtE ile yapılan DPV çalışmaları:

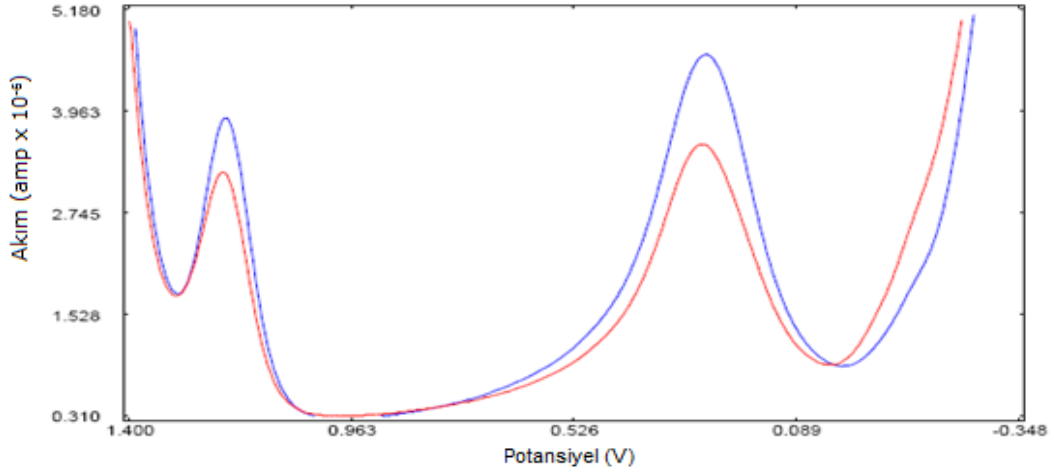
CV yöntemi ile PtE kullanılarak VAD için herhangi bir pik elde edilemediğinden, DPV tekniği ile herhangi bir pik elde edilip edilemeyeceğini incelemek amacı ile çalışmalar yapıldı.

PtE ile ve pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, 1 mM VA içeren çözelti içerisinde, 0,5 mM VAD eklenerek, anodik ve katodik yönde DPV eğrileri alındı.



Şekil 4.31. PtE ile DPV tekniği kullanılarak VA yükseltgenme piki üzerine VAD etkisi

2 mM VA, 2 mM VA ve 1 mM VAD içeren çözeltiye ait anodik DPV' ler



Şekil 4.32. PtE ile DPV tekniği kullanılarak VA indirgenme piki üzerine VAD etkisi

2 mM VA, 2 mM VA ve 1 mM VAD içeren çözeltiye ait, katodik DPV ler

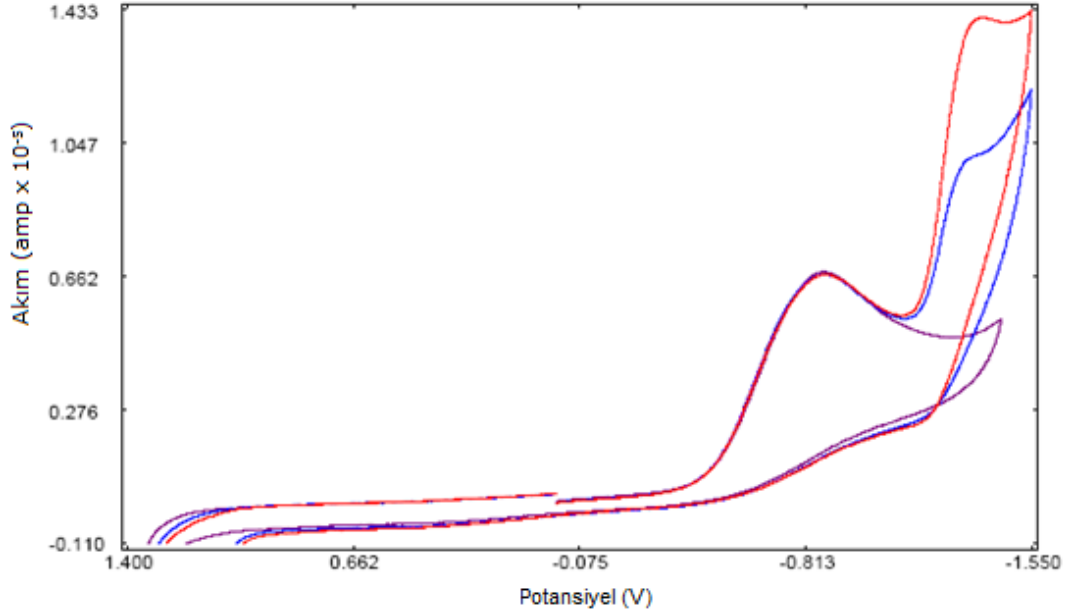
Anodik ve katodik yönde elde edilen eğriler incelendiğinde, DPV yöntemi ile de VAD için herhangi bir akım değişimi gözlenemedi, CV de olduğu gibi, VAD eklenmesi ile meydana gelen seyrelmelerden dolayı VA ya ait piklerin akımlarında azalmalar gözlemlendi.

DPV ile yapılan çalışmalara benzer şekilde SWV yöntemi ile yapılan çalışmalarda da VAD içermeyen ve içeren çözeltilere ait voltamogramlar karşılaştırıldığında yine var olan pikler konsantrasyon değişiminden dolayı azalırken, VAD e ait herhangi bir akım değişimi gözlemlenemedi. PtE ile tartarat tamponu içerisinde çözeltinin pH si ve çalışılan voltametrik yöntemi değiştirilerek çeşitli uygulamalar yapılmasına rağmen VAD e ait herhangi bir pik veya akım değişimi gözlenemedi.

PtE ile katodik yönde yapılan potansiyel taramalarında; çalışılan pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde H_2 çıkış potansiyeline çok yakın bir bölge olan -400 mV civarında tamamlanan indirgenme piki, nicel amaçlarla kullanılabilirliği sınırlamaktadır. Da ha geniş katodik çalışma bölgesi vaadeden GCE ile VAD nin indirgenme pikinin incelenmesinin daha uygun olacağı kanaatine erişildi.

4.1.3.2 VAD için GCE ile yapılan çalışmalar

İlk olarak GCE ile CV yöntemi ile pH 3,5 tartarat tamponu zemin elektrolit olarak alınarak üzerine eklenen 0,5 – 1,0 mM VAD çözeltilerinin akım potansiyel eğrileri incelendi.



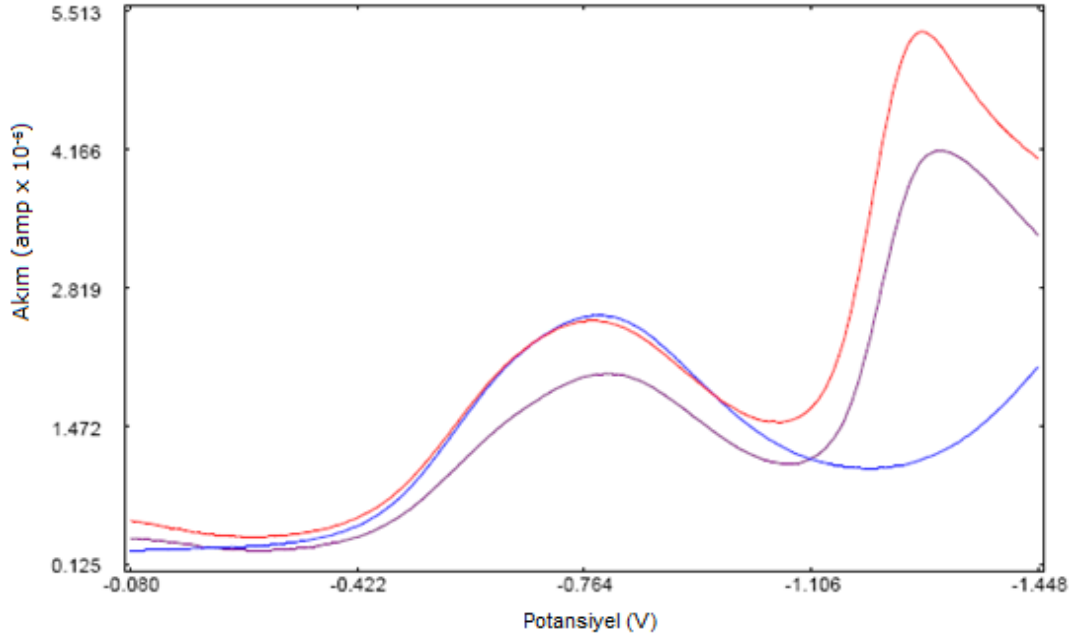
Şekil 4.33. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile VAD incelemesi
Zemine ait CV, 0,5 mM VAD e ait ve 1 mM VAD e ait CV ler

Çevrimsel voltamogramlar incelendiğinde, anodik bölgede, VAD içeren ve içermeyen çözeltilere ait voltamogramlarda bir fark gözlenmezken, katodik bölgede, -1380 mV potansiyel civarında, VAD eklenmesi ile ortaya çıkan ve VAD konsantrasyonu ile doğrusal olarak akım büyüklüğü artan bir pik belirlendi. PtE un aksine GCE üzerinde VAD için voltametrik bir yanıt elde edilebileceği belirlenmiş oldu.

a) GCE ile VAD için yapılan DPV çalışmaları:

VAD için, CV ile elde edilen katodik indirgenme pikinin puls teknikleri ile daha belirgin hale getirilmesi amacıyla sistematik bir inceleme gerçekleştirildi.

Öncelikle, DPV tekniği kullanılarak 100 ve 200 ms puls periyotlarında, 0,5 ve 1 mM VAD çözeltilerine ait DPV ler alındı.



Şekil 4.34. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile VAD' e ait farklı pus periyotlarındaki DPV ler

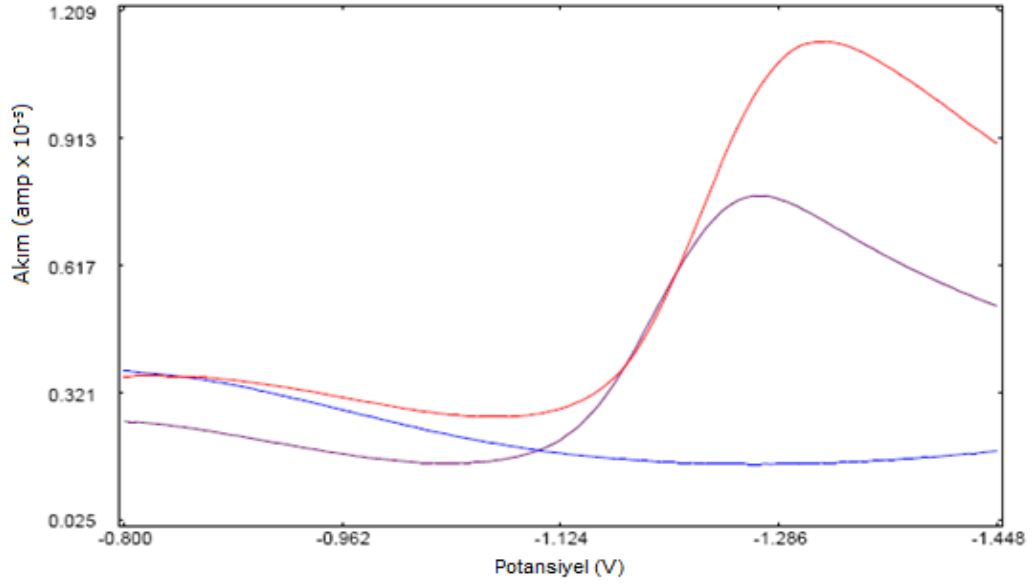
Zemine, 100 ms puls periyodu ile 0,5 mM VAD ye ve 200 ms puls periyodu ile 0,5 mM VAD e ait DPV lar

Elde edilen DPV lar incelendiğinde; VAD için daha önce CV ile -1380 mV potansiyel civarında ortaya çıkan pikin potansiyeli, DPV ile -1280 mV değerine kaydıgı gözlemlendi. Puls periyodunu değiştirerek yapılan çalışmalarda ise 100 ms puls periyodu ile daha iyi piklerin elde edildiği görüldü.

b) GCE ile VAD için yapılan SWV çalışmaları:

DPV ile elde edilen piklerin iyileştirilmesi amacıyla, elde edilen pik akımlarına SWV etkisi incelendi.

Bu amaçla, SWV yöntemi ile 0,5 mM VAD içeren çözeltiler ile çalışmalar yapıldı. Elde edilen pikler, DPV ile elde edilen piklerle karşılaştırıldı.



Şekil 4.35. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile VAD piki için DPV ve SWV yöntemlerinin karşılaştırılması

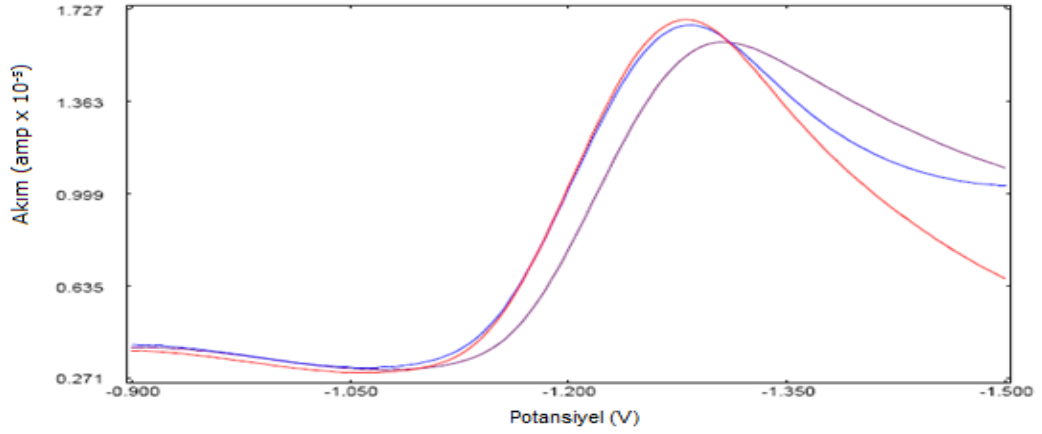
Zemine ait eğri, SWV yöntemi ile ve DPV yöntemi ile 1 mM VAD ait eğriler

Pikler incelendiğinde, aynı konsantrasyondaki çözeltiler için, SWV yöntemi ile elde edilen pikin akım büyüklüğü, DPV ile elde edilen pikin akım büyüklüğünden daha yüksek ve dolayısıyla daha duyarlı analizlere elverişli olduğu görüldü.

Böylece; VAD analizi için de daha önce VA analizi için en uygun piklerin elde edildiği çalışma şartları olan, GCE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, SWV yöntemi kullanılarak hassas analizler için elverişli pikler elde edilmiştir.

c) VAD için elde edilen pik üzerine, VA ve H₂O₂ maddelerinin girişim etkisi:

GCE ile pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde SWV yöntemi kullanılarak VAD için elde edilen piklerin gerçek reaksiyon şartlarında da analiz için kullanışlı olup olmadığını incelemek amacı ile bazı çalışmalar yapıldı. Bu amaçla ortamda analiz sırasında bulunabilecek olan VA ve H₂O₂ moleküllerinin VAD pikleri ile girişim yapıp yapmadığını, VAD e ait piklerin bu moleküllerin varlığında ne derece değişim gösterdiğini incelemek amacı ile 2 mM VAD içeren çözelti üzerine, önce 3 mM H₂O₂, ardından da 2 mM VA ekleyerek voltamogramları alındı. Elde edilen voltamogramlar yalnızca VAD içeren çözeltilere ait voltamogramla karşılaştırıldı.



Şekil 4.36. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE elektrot ile SWV yöntemi kullanılarak VAD piki üzerine girişim etkisi

2 mM VAD için, 2 mM VAD + 3 mM H₂O₂ için, 2 mM VAD + 3 mM H₂O₂ + 2 mM VA için elde edilen SWV lar

Voltamogramlar incelendiğinde, VAD piki üzerine, 3 mM H₂O₂ eklendiği durumda önemli bir değişiklik olmazken, bu çözelti üzerine 2 mm VA eklendiğinde pik potansiyelinin biraz daha katodik bölgeye kaydığı ve pik akımında küçük bir değişime yol açtığı gözlemlendi

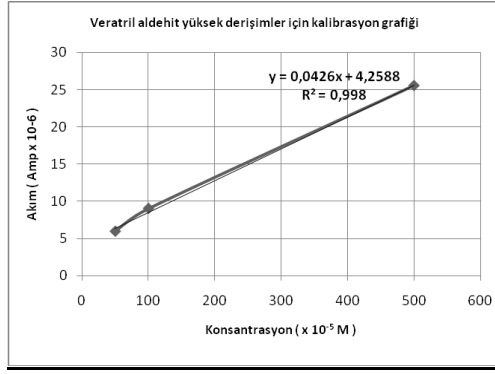
4.1.3.3. VAD için pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde hazırlanan kalibrasyon grafikleri

VAD analizi için optimizasyonu yapılan çalışma şartlarında girişim etkileri de incelendikten sonra, yöntemin izin verdiği çalışma koşullarında kalibrasyon grafiğini hazırlamak amacıyla VAD konsantrasyonu ile katodik pik akımı değişimleri incelendi. Yüksek ve düşük konsantrasyonlarda hazırlanan veratril aldehit çözeltileri ne karşılık elde edilen akım büyüklükleri bulundu. Sonuçlar çizelge 4.2 de gösterilmiştir.

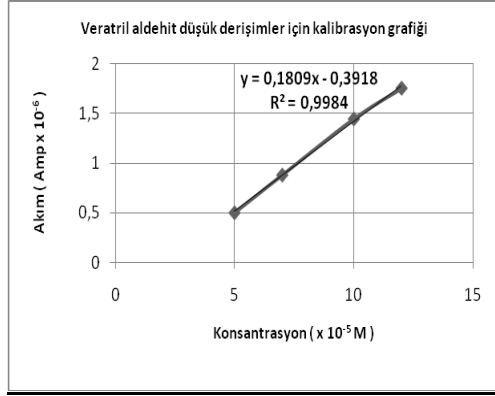
Çizelge 4.2. Veratril aldehite ait düşük ve yüksek konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler için elde edilen akım büyüklükleri

Düşük konsantrasyonlar için		Yüksek konsantrasyonlar için	
Konsantrasyon (M x10 ⁻⁵)	Akım (amp x 10 ⁻⁶)	Konsantrasyon (M x10 ⁻⁵)	Akım (amp x 10 ⁻⁶)
5	0,5	50	5,948
7	0,88	100	9,022
10	1,446	500	25,527
12	1,756		

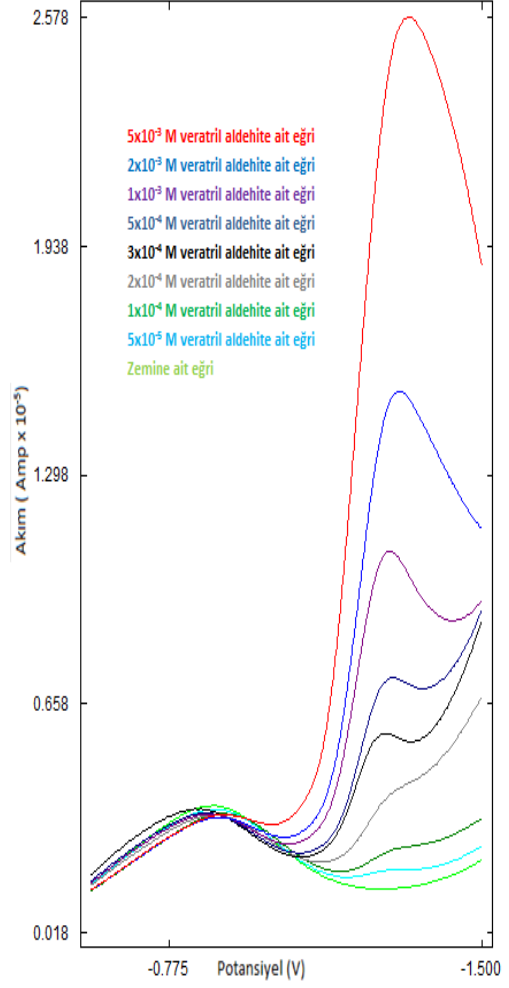
Çizelge 4.2 deki verilerden faydalanarak pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde veratril aldehit için yüksek ve düşük konsantrasyonlarda olmak üzere iki ayrı kalibrasyon grafiği hazırlandı.



Şekil 4.37. VAD için, yüksek konsantrasyonlarda pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.38. VAD için, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, düşük konsantrasyonlarda elde edilen kalibrasyon grafiği



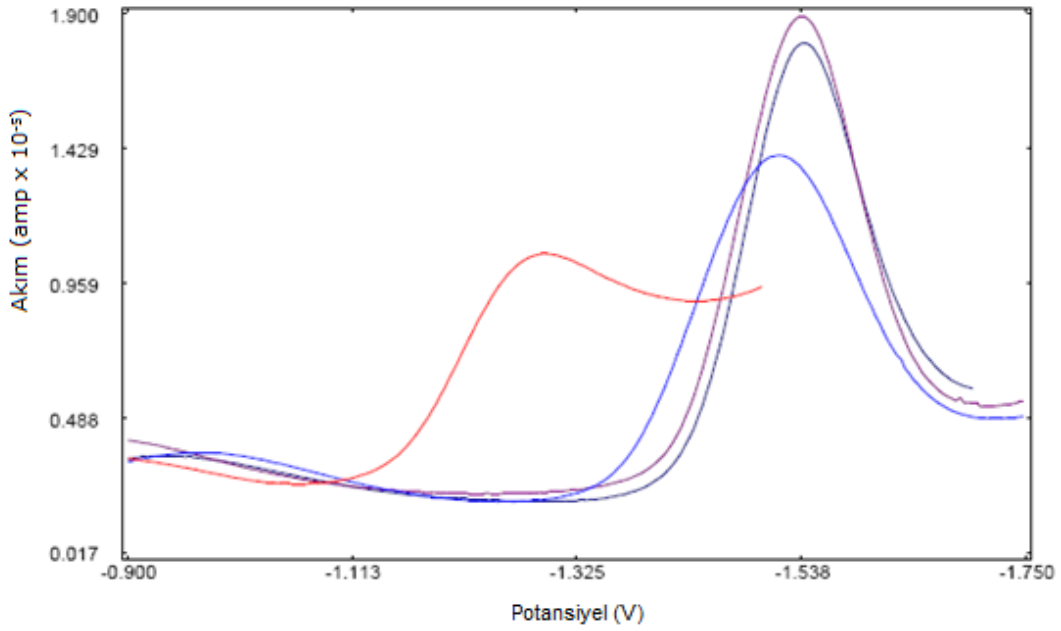
Şekil 4.39. VAD için, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, GCE ile SWV yöntemi kullanılarak, elde edilen konsantrasyon-akım eğrileri

VAD için, 10^{-5} M dan 10^{-3} M arasında çeşitli konsantrasyonlarda ki çözeltiler ile kalibrasyon grafikleri hazırlandı. Sonuçlar incelendiğinde, gerek yüksek gerekse düşük konsantrasyonlarda yeterince doğrusal grafiklerin elde edildiği görüldü. Böylece, veratril alkol için en uygun analiz şartları olarak seçilen pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde GCE ile SWV yöntemi kullanarak VA ve VAD' in yan yana analizlenebileceği görülmüş oldu.

4.1.3.4. VAD için bazik pH lerde yapılan çalışmalar

VA analizi için en uygun çalışma çözeltisi olarak seçilen pH 3,5 tartarat tamponunun VAD analizi için de kullanılabileceği görüldükten sonra, bu koşulların VAD analizi için de en uygun çalışma koşulları olup olmadığını belirlemek amacıyla SWV yöntemi kullanılarak, bazik pH deki tamponlar içerisinde GCE üzerinde VAD nin voltametrik davranışı incelendi.

VAD için bazik bölge çalışmalarında, pH 7,0 ve 9,0 Britton-Robinson tamponu ile pH 9,0 amonyak tamponu ile 1 mM VAD için SWV eğrileri alındı ve pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde 1 mM VAD için alınan voltamogramlarla karşılaştırıldı.



Şekil 4.40. GCE ile SWV yöntemi kullanılarak VAD piki üzerine çözelti pH sinin etkisi

pH 3,5 tartarat tamponu, pH 7,0 Britton-Robinson tamponu, pH 9,0 Britton-Robinson tamponu, pH 9,0 amonyak tamponu içerisinde elde edilen SWV lar

Bazik tamponlarla yapılan çalışmalarda VAD için elde edilen pikler, Şekil 2.1.32 de gösterildi. Şekil 4.40 daki pikler incelendiğinde, bazik tamponlar içerisinde elde edilen piklerin akım büyüklükleri, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde elde edilen piklerinkinden daha büyük olduğu görüldü. Pikleri genel olarak incelendiğinde; çözelti

pH si arttıkça VAD için elde edilen pikin akım büyüklüğünün arttığı ve pikin yerinin daha negatif potansiyellere kaydığı görüldü.

Aynı bazik pH de (pH 9,0) çalışılan Britton-Robinson ve amonyak tamponlarından ise, Britton-Robinson tamponu içerisinde daha yüksek akım büyüklüğüne sahip indirgenme piki elde edildi.

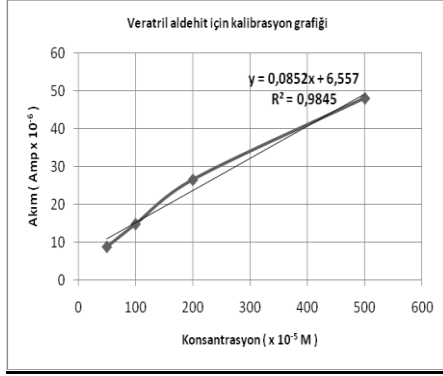
Böylece VAD analizi için bazik pH lerdeki çözelti ortamının daha kullanışlı olduğu belirlendi. GCE ile denenen tamponlar arasında pH 9,0 Britton - Robinson tamponu olduğu ve SWV ile analiz amacına daha uygun pikler elde edilebileceği belirlenmiş oldu.

4.1.3.5. VAD için pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde hazırlanan kalibrasyon grafikleri

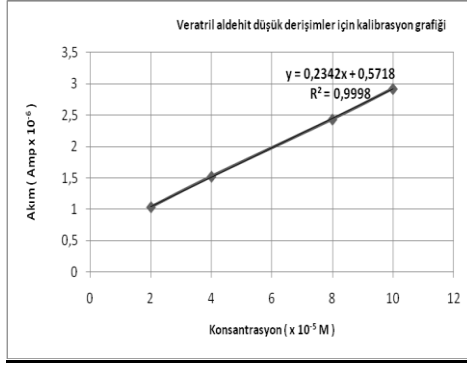
VAD için, bazik pH de en iyi piklerin elde edildiği, pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde de belli konsantrasyonlar da hazırlanan çözeltilerde elde edilen akım büyüklüklerinden yararlanarak, yüksek ve düşük konsantrasyonlar da kalibrasyon grafikleri hazırlandı.

Çizelge 4.3. Veratril aldehite ait, pH 9,0 da düşük ve yüksek konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler için elde edilen akım büyüklükleri

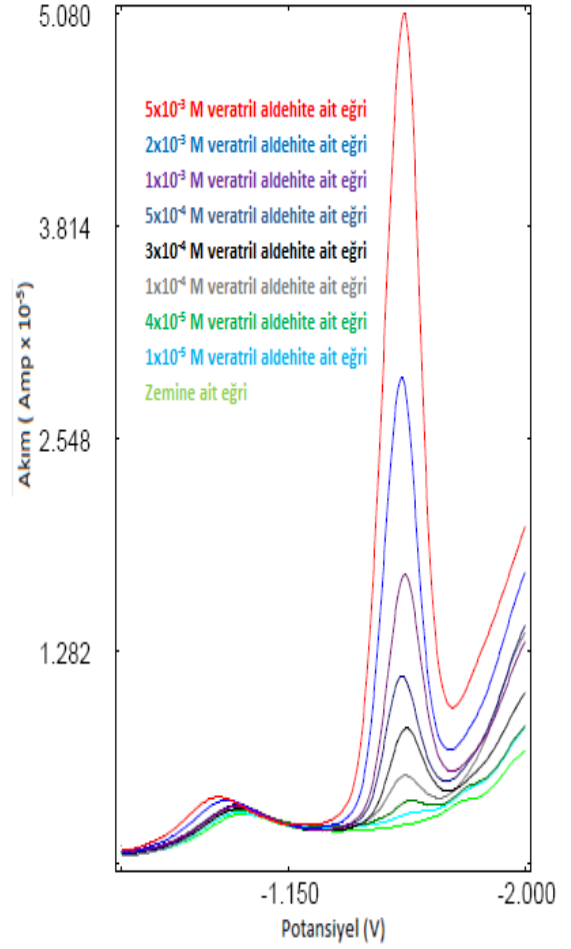
Düşük konsantrasyonlar için		Yüksek konsantrasyonlar için	
Konsantrasyon (M x10 ⁻⁵)	Akım (amp x 10 ⁻⁶)	Konsantrasyon (M x10 ⁻⁵)	Akım (amp x 10 ⁻⁶)
2	1,034	50	8,91
4	1,521	100	14,93
8	2,433	200	26,64
10	2,900	500	48,14



Şekil 4.41. VAD için, pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde yüksek elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.42. VAD için, pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde, düşük derişimler için elde edilen kalibrasyon grafiği

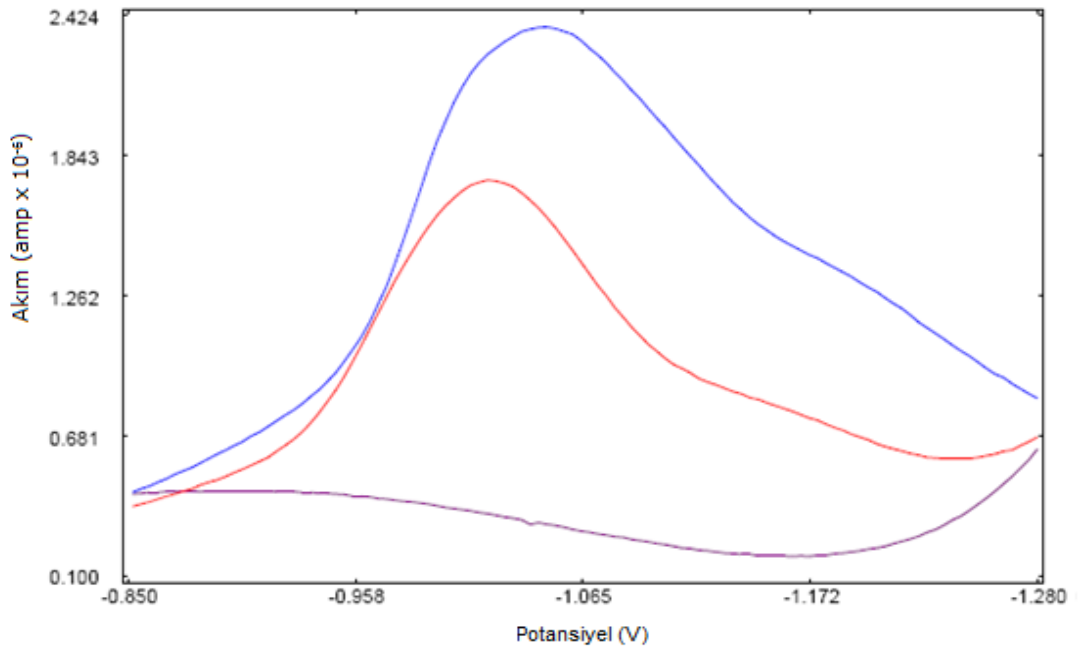


Şekil 4.43. VAD için, pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde, GCE ile SWV yöntemi kullanılarak, elde edilen konsantrasyon-akım eğrileri

pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde VAD'e ait yüksek ve düşük konsantrasyonlarda ki çözeltiler için elde edilen kalibrasyon grafikleri incelendiğinde, özellikle düşük konsantrasyonlardaki örnekler için pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde elde edilenden daha doğrusal grafikler elde edildiği görüldü.

4.1.3.6. VAD için civa damla elektrot (CDE) ile yapılan çalışmalar

VAD' in indirgenme potansiyelinin çok negatif potansiyel bölgesinde olması dikkate alınarak, bu maddenin, negatif çalışma potansiyeli çok geniş bir elektrot olan CDE ile de analizlenebileceği düşünüldü. Bu amaçla askıda civa damla elektrodu (HMDE) kullanılarak, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde VAD için herhangi bir pik elde edilip edilemeyeceğini incelemek amacı ile DPV ve SWV teknikleri ile çalışmalar yapıldı.



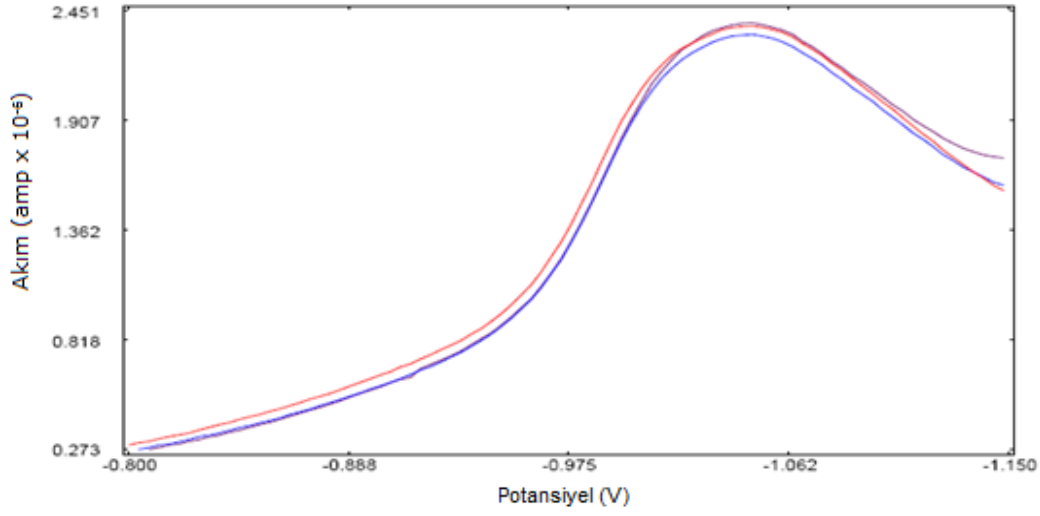
Şekil 4.44. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde CDE ile VAD piki için SWV ve DPV yöntemlerinin karşılaştırılması

Zemine ait 0,2 mM VAD için, **SWV yöntemi ve DPV yöntemi** ile elde edilen eğriler

Şekil 4.44 de görüldüğü gibi, CDE ile SWV ve DPV yöntemleri ile -1000 mV potansiyel civarında, VAD eklenmesi ile ortaya çıkan bir pik gözlemlenmiştir. Bu piklerden, SWV yöntemi ile elde edilen pikin beklendiği gibi DPV yöntemi ile elde edilen pikten daha yüksek pik akımına sahip olduğu görülmüştür.

CDE kullanarak SWV ile yapılan çalışmalarda VA'nın herhangi bir girişim etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla, 0,25 mM VAD içeren çözeltiye 0,05 – 0,25 mM

VA eklenerek aynı deneysel koşullarda akım potansiyel eğrileri alındı. Çalışmaya ait eğriler, şekil 4.45 de gösterilmiştir.

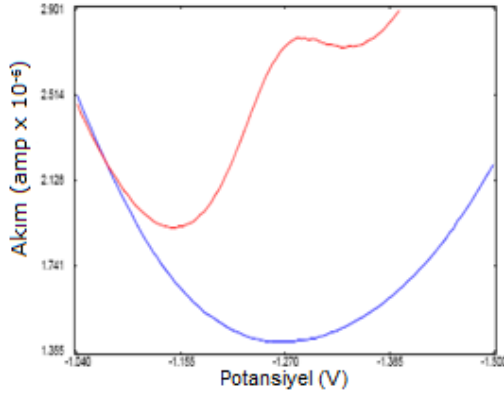


Şekil 4.45. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, civa damla elektrot ile VAD piki üzerine girişim etkileri

0,25 mM VAD için, 0,25 mM VAD ve 0,1 mM VA için, 0,25 mM VAD ve 0,25 mM VA için elde edilen SWV lar

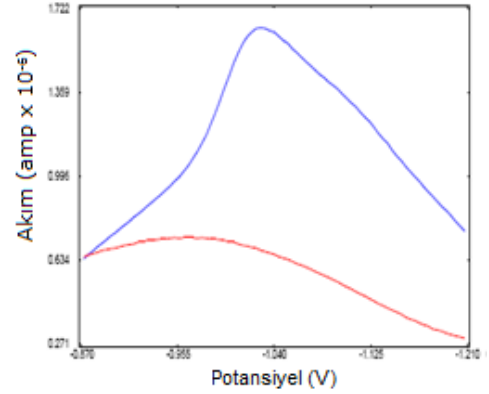
HDME ile elde edilen SWV lar incelendiğinde, VA' ün, VAD e ait indirgenme piki üzerine girişim etkisinin olmadığı görülmüştür.

VAD için çeşitli elektrot ve çözeltilerle yapılan çalışmalardan, GCE ve HMDE ile yapılan çalışmalarda analize uygun sonuçlar elde edildi. Aynı şartlarda, pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde ve SWV yöntemi kullanılarak, 0,1 mM VAD için, GCE ve HMDE ile elde edilen eğriler Şekil 4.46 ve Şekil 4.47'de gösterilmiştir.



Şekil 4.46. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde GCE ile 0,1 mM VAD' e ait pik

Zemine ait ve **0,1 mM VAD** e ait SWV



Şekil 4.47. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde CDE ile 0,1 mM VAD' e ait pik

Zemine ait ve **0,1 mM VAD** e ait SWV

VAD' in aynı konsantrasyona sahip çözeltileri için GCE ve HMDE ile yapılan çalışmalarda elde edilen voltamogramlar karşılaştırıldığında, GCE ile -1250 mV potansiyellerde ortaya çıkan VAD e ait pik HMDE ile -1000 mV lara kaymıştır. GCE de zeminde var olmayıp VAD eklenmesi ile ortaya çıkan pik, HMDE de, zeminde var olan bir akım büyümesinin üzerinde bir pik olarak görülmüştür. Şekil 4.46 ve şekil 4.47 de görüldüğü gibi, GCE ile elde edilen pikin akım büyüklüğü, HMDE ile elde edilen pikin akım büyüklüğünden biraz daha fazladır. Ayrıca, CDE' un H_2O_2 bulunan ortamda çalışmaya elverişli olmamasından dolayı, VAD için en uygun çalışma elektrodu olarak GCE seçilmiştir.

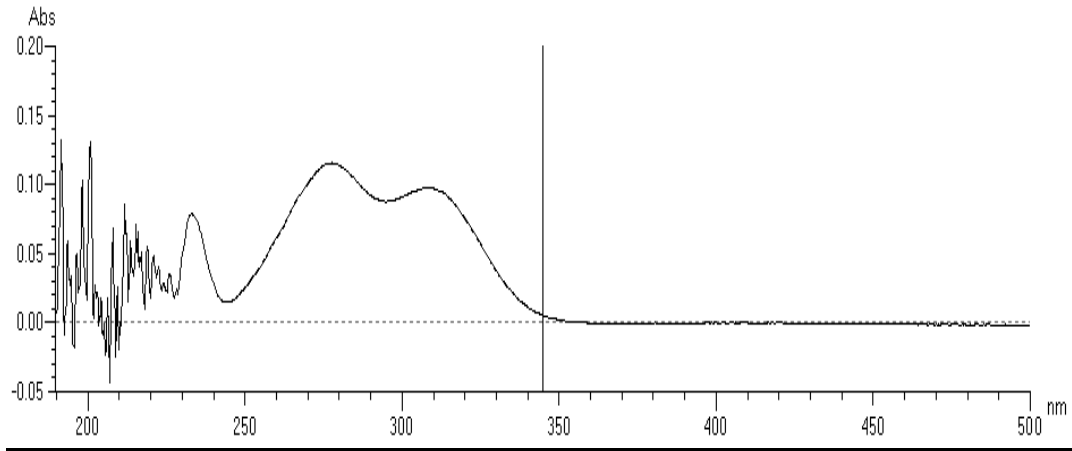
Böylece, VA ve VAD' in voltametrik yöntemlerle analizi için, çalışma elektrodu, çalışma çözeltisi, çözelti pH si ve voltametrik yöntem optimizasyonu yapılmış ve optimizasyonu yapılan şartlarda, ortamda bulunabilecek diğer moleküllerle girişim etkileri incelenmiş, bu şartlarda kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır.

4.2. UV – VIS Spektroskopik Çalışmalar

Bilindiği gibi lignin peroksidaz enziminin lignini parçalaması sırasında VA' ün aldehite yükseltgenmesi ve bu bileşiğin 310 nm deki moleküler soğurumun dan yararlanılarak nicel değerdendirmeler yapılmaktadır. VA ve VAD için, tek başlarına ve birlikte buldukları çözeltilerde UV-VIS bölgede spektroskopik incelemeler de yapılarak elde edilen soğurum piklerinin hangi yapılardan kaynaklandığı ve bu iki bileşiğin soğurum karakteristiğinin birbirini etkileyip etkilemedikleri belirlenmeye ve gösterilmeye çalışıldı.

4.2.1. VAD ile ilgili spektroskopik çalışmalar

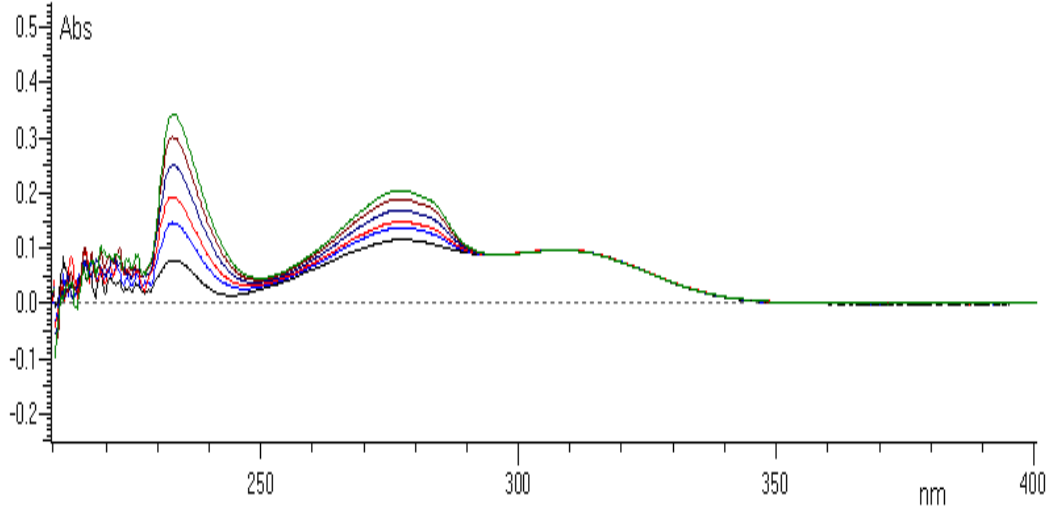
VAD ile ilgili, UV-VIS bölgede ilk olarak, yalnızca VAD içeren çözeltiliye ait UV-VIS bölgede spektrum alındı. Alınan spektrum, şekil 4.48 de gösterilmiştir.



Şekil 4.48. 1×10^{-5} M VAD ait UV-VIS bölgede elde edilen spektrum

Şekil 4.48 de görüldüğü gibi, pH 3,5 tartarat çözeltilisinde $10 \mu\text{M}$ (10^{-5} M) VAD içeren çözeltilinin geniş bir dalga boyu aralığında UV-VIS spektroskopik incelenmesi yapıldığında, beklendiği gibi görünür bölgede herhangi bir soğurum bölgesi görülmezken, UV bölgede 235, 275 ve 310 nm dalga boylarında üç ayrı soğurum bölgesinin ortaya çıktığı belirlendi.

VAD için gözlenen bu piklerin, çözeltiye VA eklenmesi ile ne şekilde etkileneceği incelenmiştir. Bu amaçla, 1×10^{-5} M VAD içeren çözelti üzerine, 5 kez, her seferinde 1×10^{-5} M artış oluşturacak şekilde VA eklendi ve spektrumda ki değişimler incelendi



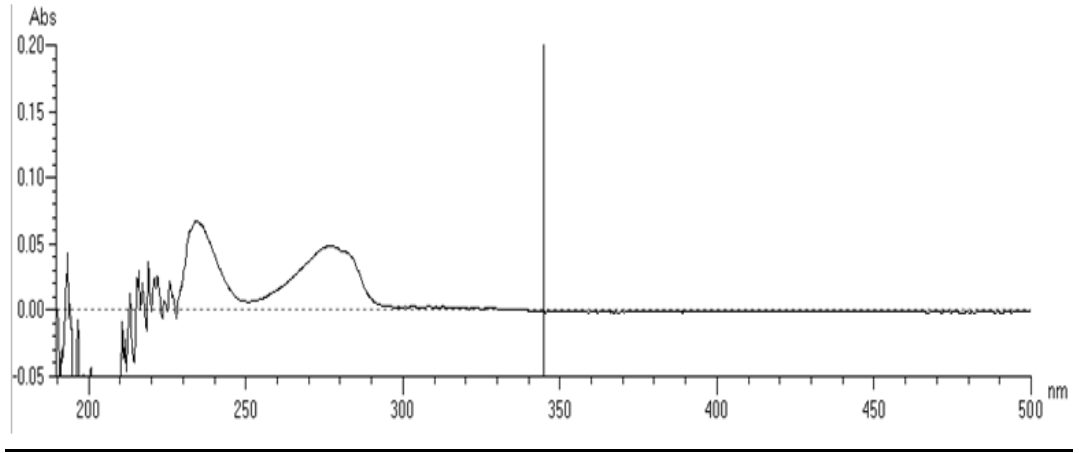
Şekil 4.49. VAD spektrumu üzerine VA' ün etkisi

1×10^{-5} M VAD ait, 1×10^{-5} M VAD + 1×10^{-5} M VA e ait, 1×10^{-5} M VAD + 2×10^{-5} M VA e ait, 1×10^{-5} M VAD + 3×10^{-5} M VA e ait, 1×10^{-5} M VAD + 4×10^{-5} M VA e ait, 1×10^{-5} M VAD + 5×10^{-5} M VA e ait UV-VIS bölgede elde edilen spektrum

VAD çözeltisi üzerine her seferinde $10 \mu\text{M}$ artışlar olacak şekilde VA eklendiği zaman 235 ve 275 nm de düzenli sayılabilecek artışlar olurken, 310 nm deki soğurum bölgesi VA eklemelerinden hiç etkilenmemektedir. Bu durum 235 ve 275 nm deki soğurumların veratril (3,4 – dimetoksi) grubundan, 310 nm deki soğurumun ise aldehit grubundan kaynaklandığını düşündürmüştür.

4.2.2. VA ile ilgili spektroskopik çalışmalar

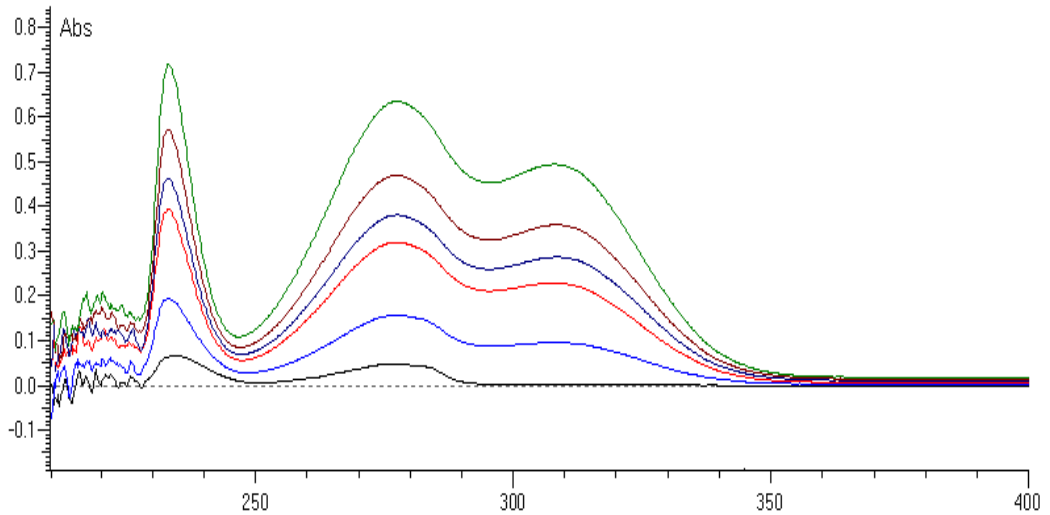
VA için de, VAD'de olduğu gibi, yalnızca VA içeren çözeltiye ait spektrum alındı ve pikler incelendi.



Şekil 4.50. 1×10^{-5} M VA ait UV-VIS bölgede elde edilen spektrum

Şekil 4.50'de görüldüğü gibi, görünür bölgede herhangi bir soğurum bölgesi görülmezken, UV bölgede 235 ve 275 nm dalga boylarında iki ayrı soğurum bölgesinin ortaya çıktı.

Ardından, 10^{-5} M VA içeren bu çözeltiye, her seferinde, 1×10^{-5} M olacak şekilde, VAD eklendi ve VA için gözlenen piklere eklenen VAD' in etkisi incelendi.



Şekil 4.51. VA spektrumu üzerine VAD' in etkisi

1×10^{-5} M VA e ait, 1×10^{-5} M VA + 1×10^{-5} M VAD e ait, 1×10^{-5} M VA + 2×10^{-5} M VAD e ait, 1×10^{-5} M VA + 3×10^{-5} M VAD e ait, 1×10^{-5} M VA + 4×10^{-5} M VAD e ait, 1×10^{-5} M VA + 5×10^{-5} M VAD e ait UV-VIS bölgede elde edilen spektrumlar

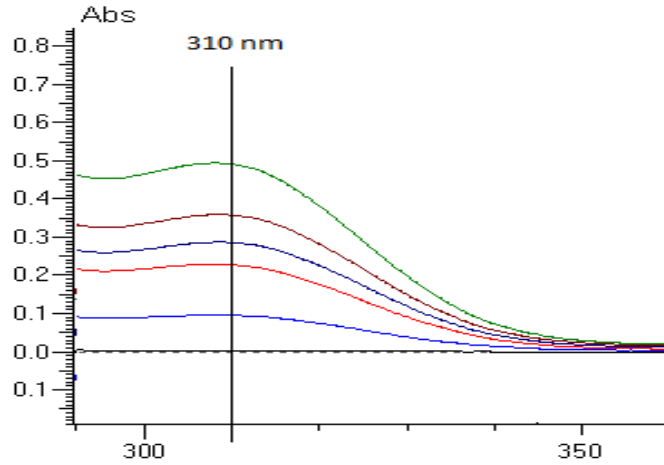
Şekil 4.51 incelendiğinde, VA içeren çözeltiye, VAD eklenmesinden sonra, yalnızca VA içeren çözeltide var olan, 235 ve 275 nm dalga boylarında var olan soğurum pikleri büyürken, VAD eklenmesi ile ortaya çıkan 310 nm deki pik de, artan VAD konsantrasyonu ile düzenli olarak artış göstermiştir.

UV-VIS spektroskopik yöntemlerle elde edilen sonuçlar incelendiğinde, VA içeren çözelti üzerine, VAD eklendiğinde, 235 ve 275 nm dalga boylarında var olan soğurum piklerinde artış gözlenirken, VAD eklenmesi ile 310 nm de de bir soğurum meydana geldi. Ancak VAD içeren çözelti üzerine VA eklenmesi ile, 235, 275 ve 310 nm dalga boylarında var olan soğurumlarda, 235 ve 275 nm ki soğurumlarda artış meydana gelirken, 310 nm de buluna soğurumda herhangi bir değişim gözlenmedi. Buradan; 235, 275 nm deki soğurumlar moleküldeki veratril grubundan kaynaklanırken, moleküle karbonil grubunun kazanılmasıyla 310 nm deki soğurumun ortaya çıktığı görülmüş oldu.

Analiz ortamında hem VA' ün hem de VAD' in bulunması muhtemeldir ve VA' ün pikleri üzerine VAD' in girişimi kaçınılmaz olur. Bu nedenle spektroskopik yöntemlerle, ortamdaki VA miktarından etkilenmeyen, büyüklüğü yalnızca VAD miktarı ile değişen 310 nm deki pikden yararlanarak, VAD ile ilgili doğru ve hassas analizlerin yapılacağı görülmüş oldu.

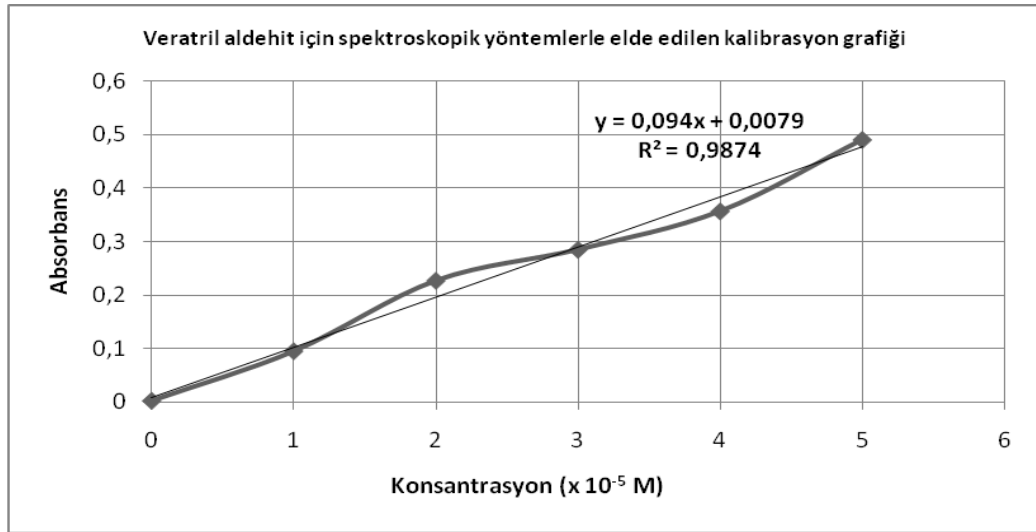
4.2.3. VAD için pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde spektroskopik yöntemle hazırlanan kalibrasyon grafiği

VAD' in, spektroskopik yöntemle analizi için, kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Hazırlanan kalibrasyon grafiğine ait 310 nm dalga boyundaki absorbans değerleri Şekil 4.52' te gösterilmiştir.



Şekil 4.52. pH 3,5 tartarat içerisinde, farklı konsantrasyondaki VAD çözeltilerine ait spektrumlar

VAD içermeyen çözeltiliye ait, 1×10^{-5} M VAD e ait, 2×10^{-5} M VAD e ait, 3×10^{-5} M VAD e ait, 4×10^{-5} M VAD e ait, 5×10^{-5} M VAD e ait UV-VİS bölgede elde edilen spektrum



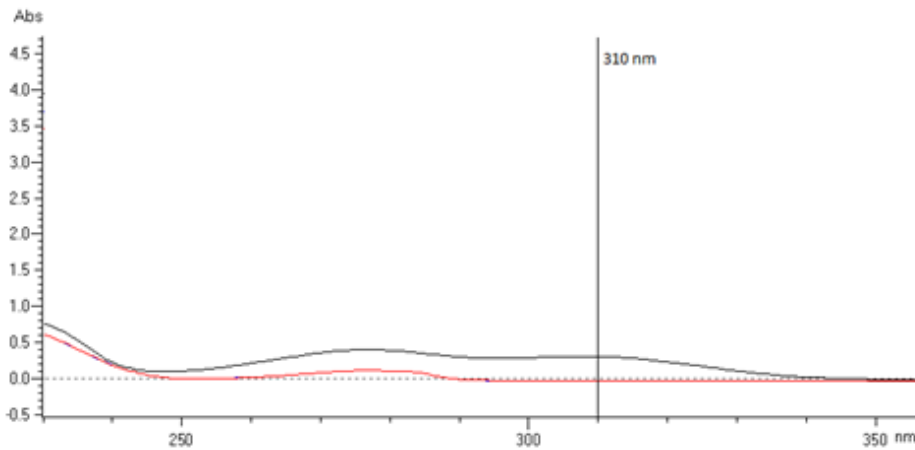
Şekil 4.53. pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde, spektroskopik yöntemlerle, 10^{-5} M konsantrasyonlar için elde edilen kalibrasyon grafiği

Spektroskopik yöntemlerle, UV bölgede, 310 nm dalga boyunda, elde edilen pikden yararlanarak, çizilen kalibrasyon grafiği gösterilmiştir. Grafikte bazı noktalarda sapmalar olmasına rağmen, analizler için doğrusal bir grafik elde edildi.

4.2.4. Voltametrik ve spektroskopik yöntemlerin birlikte kullanımı ile VA' ün yükseltgenme ürününün VAD olduğunun gösterilmesi

Yapılan çalışmada VA molekülünün yükseltgenme ürününün VAD olduğu yani, VA e ait yaklaşık 1200 mV potansiyelde meydana gelen yükseltgenme sırasında oluşan ürününün VAD olduğu belirtildi. Literatürde de bu durumu destekleyen çeşitli yayınlar bulunmaktadır. Ancak bu yükseltgenme sırasında gerçekten VAD oluştuğunu çalışmamızda da göstermek ve ürünün VAD olduğunu ispatlamak amacı ile voltametrik ve spektroskopik yöntemler birlikte kullanılarak bir inceleme yapıldı. Çalışmada, öncelikle 1×10^{-5} M VA içeren çözeltiliye ait UV spektrumu alındı. Ardından bu çözelti voltametri hücrelerine içerisine koyuldu ve yüzeyi kullanılan çalışma elektrotlarından çok daha büyük olan Pt kafes elektrot kullanarak, 30 dakika boyunca VA' ün yükseltgenme potansiyeli olan 1200 mV potansiyel uygulandı, bu çözeltinin tekrar UV spektrumu alındı. Elde edilen spektrumlar şekil 4.54 te karşılaştırıldı.

İlk ve son duruma ait spektrumlardaki farklar incelendiğinde, potansiyel uygulaması yapılmadan önce, herhangi bir soğurum gözlenmeyen 310 nm dalga boyunda, potansiyel uygulamasının ardından belirgin bir soğurum gözlenmiştir. 310 nm de gözlenen bu soğurum ise veratril aldehit varlığında gözlen bir soğurumdur. Dolayısı elektrokimyasal çalışmalarda VA nın yükseltgenme ürününün VAD olduğu kesinlikle gösterilmiş oldu.



Şekil 4.54. 1×10^{-5} M VA içeren çözeltiliye 1200 mV potansiyel uygulaması yapılmadan ve yapıldıktan sonra elde edilen spektrumlar

Potansiyel uygulaması **öncesinde** ve **sonrasında** elde edilen UV spektrumlar

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kimya literatüründe yeterli bilgi bulunmayan; VA / VAD çiftinin voltametik davranışının ve yan yana analizlenebilirliğinin incelenmesi adlı çalışmada, lignin molekülünün enzimatik yollarla parçalanmasının gerçekleştiği süreçlerde, mediatör olarak yer alan bu redoks çiftinin, H₂O₂ bulunan bir ortamda girişimlerden etkilenmeyecek şekilde analizlenmeleri için voltametik bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Voltametik yöntemlerle VA ve VAD nin elektroaktifliği incelenirken; geniş bir pH aralığında farklı tampon çözeltiler elektrolit olarak kullanılarak, Pt, GCE, grafit, Au ve askıda Hg damla elektrodu ile sistematik bir inceleme gerçekleştirildi. Çalışma koşullarının belirlenmesinde VA ve VAD için en yüksek akım büyüklüğüne sahip piklerin elde edilmesi ve bu pik büyüklüklerinin H₂O₂ den etkilenmemesi göz önüne alındığı gibi, çalışmanın devamında lignin enzimatik elektrodunun hazırlanacağı da öngörülerek LiP enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH aralığında (pH 3,0-4,5) kalınmasına da özen gösterildi. Her iki bileşik için pH 3,5 tartarat tamponu içerisinde çalışılmasının en uygun koşulları oluşturacağı belirlendi.

VA nın yükseltgenme pikinin nicel analiz açısından değerlendirileceği görülerek bu bileşik için denen çalışma elektrotları arasında GCE nin SWV tekniği ile çalışılması durumunda en yüksek pik akımları ile daha yüksek duyarlıkta bir çalışma yapılabileceği belirlendi. Belirlenen bu şartlarda VA için yöntemin izin verdiği konsantrasyon aralığında çok tekrarlı denemeler ile yüksek ve düşük konsantrasyon aralıkları için kalibrasyon grafikleri hazırlandı. Geliştirilen yöntem ile yapılan denemeler sonucunda VA için 10⁻⁵ M konsantrasyona kadar hassas analizlerin yapılabileceği görüldü. 1x10⁻⁵ M VA içeren çözelti için elde edilen sonuçlara ait ortalama değer; 0,181±0,0051 µA olarak bulundu. Buradan elde edilen % bağıl standart sapma değerinin; % 2,82 olması belirlenen tekniğin uygun olduğunu göstermiştir. Yüksek konsantrasyonlar için de, geniş bir konsantrasyon aralığında doğrusal çalışma aralığının elde edilebileceği belirlendi. Hazırlanan kalibrasyon grafiklerinde korelasyon katsayıları (R²) küçük konsantrasyonlar için hazırlanan grafikte R² = 0,9998 bulunurken, yüksek konsantrasyonlarla (> 10⁻³M) geniş bir aralıkta hazırlanan grafikte 0,9855 olmaktadır.

VA için belirlenen pH 3,5 tartarat çözeltisi şartlarında, VAD'nin indirgenmesi için çalışma elektrodu ve voltametrik çalışma koşulları belirlenmesi yapıldı, GCE üzerinde gene SWV tekniği ile çalışılması benimsenerek kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Benimsenen çalışma koşullarında VAD için de 10^{-5} M konsantrasyonlara kadar duyarlı ve güvenilir nicel analizler yapılabileceği, geniş bir konsantrasyon aralığında doğrusal çalışma bölgesi elde edilebileceği belirlendi. 2×10^{-5} M VAD içeren çözelti için elde edilen sonuçlara ait ortalama değer; $1,040 \pm 0,011$ μ A olarak bulundu. Buradan elde edilen % bağıl standart sapma değerinin; % 1,06 olması belirlenen tekniğin uygun olduğunu göstermiştir. VAD için elde edilen yüksek konsantrasyonlardaki kalibrasyon grafiğinde $R^2=0,9980$ iken, küçük konsantrasyon bölgesi için çizilen kalibrasyon doğrusu için bu değer 0,9984 olmaktadır. Her iki bileşiğin birlikte analizlenebilirliği ve LiP enziminin yüksek aktivite göstereceği bu pH koşullarında kalibrasyon grafikleri hazırlandıktan sonra, VAD bileşiğinin tek başına analizlenebilmesi için optimum koşulların belirlenmesi için farklı çalışma ortamlarında denemeler sürdürüldü. LiP enzimi bazik ortamlarda aktivite gösterememesine rağmen, VAD için bazik pH lerde de denemeler yapıldı. pH 9 Britton-Robinson tamponu içerisinde, pH 3,5 tartarat tamponunda elde edilenden daha büyük akım büyüklüğüne sahip pikler edildi, bu çözelti şartlarında da kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. pH 9,0 Britton-Robinson tamponu içerisinde yüksek ve düşük konsantrasyonlar için elde edilen kalibrasyon grafiklerinin R^2 değerleri ise sırası ile 0,9845 ve 0,9998 olarak bulunmuştur.

VA ile VAD moleküller yapılarının voltametrik çalışmalarla sistematik incelenmesi sırasında, her iki bileşiğin de, elektrot üzerinde ön biriktirmeye elverişli olmadığı, uygulanan çeşitli biriktirme potansiyellerinin herhangi bir iyileştirici etkisi olmadığı, incelenen bileşiklerin adsorpsiyon veya elektrostatik etkileşme ile iletken yüzeyde birikmediği gözlemlendi. Bu durum sıyırma tekniklerinin kullanımının denenmesini gereksiz kıldı.

Voltametrik çalışmaların yapıldığı pH 3,5 tartarat tamponu ortamı koşullarında VA ve VAD nin geniş bir dalga boyu aralığında (1000 – 200 nm) tek başlarına ve birlikte buldukları koşullarda UV-VIS Spektrumları alındı. Renksiz olan bu çözeltilerin görünür bölgede herhangi bir elektromanyetik etkileşimi gözlenmezken, UV bölgede 240, 275 ve 310 nm de olmak üzere 3 ayrı absorpsiyon gözlemlendi. Bunlardan 240 ve 275 nm deki absorpsiyonlar hem VA hem de VAD varlığında gözlenirken, 310 nm deki

absorpsiyonun yalnızca VAD varlığında ortaya çıktığı ve VAD konsantrasyonu ile doğrusal olarak artış gösterdiği görüldü. Literatür bilgisi ile uyumlu olan bu bilgi kapsamında 310 nm deki absorpsiyon büyüklükleri yardımıyla VAD ile ilgili nicel analiz yapılabileceği belirlendi. VAD için 10^{-5} M konsantrasyon mertebesindeki çözeltiler den yararlanarak hazırlanan kalibrasyon grafikleri incelendiğinde elde edilen grafiğin R^2 değeri 0,9874 olarak bulundu. Spektroskopik yöntemlerle daha yüksek konsantrasyonlarda, yüksek soğurganlık katsayısı nedeniyle absorpsiyon >1 olmaktadır. Yüksek absorpsiyon değerlerinin nicel ölçümlerde kullanılmasındaki sınırlamalar nedeniyle VAD için yapılan spektroskopik nicel incelemeler küçük konsantrasyon bölgesi ile sınırlı tutuldu.

Spektroskopik çalışmalarda, VAD düzeyinden bağımsız olarak VA analizi için spesifik bir absorpsiyon bölgesi elde edilemediği için, yalnızca VAD miktarı ile ilgili analiz gerçekleştirilebilmiştir. Ligninin parçalanma sürecinde mediatör olarak görev alan VA-VAD çiftinin yanyana analizlenmesi için geliştirilen voltametrik yöntem ile hem VA hem de VAD'nin geniş bir konsantrasyon aralığında, birbirinin analizine girişim etkisi olmaksızın çok geniş bir konsantrasyon aralığında analizlenebileceği gösterilmiştir.

Geliştirilen bu voltametrik analiz yöntemi yardımıyla ve LiP enzimi kullanılarak lignin analizine yönelik sensör ve elektrot geliştirilmesi hedeflendiği için, özellikle atık su gibi berrak olmayan örneklerde spektroskopik ölçümlerin yapılmasından kaynaklanan zorluklar ve ölçüm tekrarlanırlığını olumsuz etkileyecek türbidimetrik etkilerden büyük ölçüde kaçınılmış oldu.

Su ve atık sularda lignin analizi için önerilen; folin fenol reaktifi ile oluşan mavi rengin, 700 nm de absorpsiyonunun ölçümü (REF) ilkesine dayanan yöntem, 8 mg/L sınırına kadar tayin edilebilirlik olanağı sağlıyor olsa da, aslında bu yöntemin folin fenol reaktifi indirgeyebilen başta tannin olmak üzere hidroksi aromatik bileşiklerin, hatta anorganik ve organik tüm indirgenlerin girişim etkisine açık olması çok önemli bir olumsuzluktur. Ayrıca özellikle yeterince berrak olmayan atık sularda yapılacak bu kolorimetrik ölçümlerin güvenilirliği ve tekrarlanırlığı da çok yüksek olamamaktadır.

Lignin parçalanma sürecinin izlenmesi veya lignin oksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için, bu süreçte açığa çıkan H_2O_2 'in, pH 3 -4,5 tartarat ortamında VA'nın

yükseltgeme ürünü olan VAD miktarı veya oluşum hızının ölçülmesi yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. VAD'nin spektroskopik ölçümünde, 310 nm'de $\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ olarak soğurganlık katsayısı belirtilen absorpsiyonundan yararlanılmaktadır (Tien and Kirk 1984). Diğer spektroskopik tayinlerde olduğu gibi, UV bölgede çalışma zorluğu, örnek çözeltinin bulanıklığından kaynaklanan olumsuzluklar, bu analiz yöntemi için de geçerli olmaktadır. Ayrıca, LiP enzim aktivitesi 0,24 $\mu\text{mol VA/dak.mL}$ düzeyinde olduğundan, ölçülebilir VAD konsantrasyonu için en az bir gece inkübasyon süresi gerekmektedir.

Tez kapsamında VA ve VAD için geliştirilen voltametrik teknikle lignin elektrodunun hazırlanması halinde, ligninin enzimatik parçalanma sürecinde mediatör olarak görev yapan bu redoks çiftinden VAD nin oluşan miktarı ölçülebileceği gibi, VA miktarındaki azalma da belirlenebilecek, yapılan analizin sağlaması da gerçekleştirilmiş olacaktır. Hazırlanacak lignin biyosensörü ile bu redoks çiftinin değişim süreci izlenerek LiP enzim aktivitesinin ölçümü için de uygun bir teknik geliştirilebilecektir.

Voltametrik yöntemin, spektroskopik yöntemlere göre görülen tek dezavantajı, elektrot hazırlama sürecinin nispeten zahmetli oluşu ve elektrot yüzeyine immobilize edilecek enzimin bir süre sonra aktifliğini yitirecek olması ve belirli periyotlarla tekrar hazırlanmasının gerekmesidir. Ancak analiz maliyeti açısından en önemli gideri oluşturan enzimin tekrar tekrar kullanılabilir olması, sürekli veya sık sık ölçüm gerektiren durumlarda avantaja dönüşecektir.

Standard Methods'da lignin analizi için önerilen yöntemde girişimlerin çok etkin olması, 700 nm de ölçülen absorpsiyonun doğal olarak renkli örneklerde önemli bir dezavantaj nedeni olması, Tien ve Kirk (1984) tarafından geliştirilen ve 310 nm'de VAD ölçümüne yönelik yöntemin çok zaman alıcı olmasının yanı sıra ortamdaki kolloidal partiküllerden olumsuz etkilenmesinin kaçınılmaz olması, geliştirilen yöntemin lignin analizi için kullanım şansını artırmaktadır. Ancak voltametrik çalışmalarda tekrarlanırlık sağlamak için elektrot yüzeyinin iyi şekilde mekanik olarak temizlenmesi ve parlatılması, uygulama sürecinin biraz daha dikkat ve el becerisi gerektirmesi, elektrokimyasal tekniklerin spektroskopi gibi genel bilgi birikiminin dışında bilgi ve beceri gerektiriyor olması gibi önerilen yöntemin olumsuzlukları göz ardı edilmemelidir.

KAYNAKLAR

Andreinko, D. 2008. Cyclic voltammetry (www.mpip-mainz.mpg.de/~andrienk/.../cyclic_voltammetry.pdf)

Anonim 1., Polarografi. <http://www.deu.edu.tr/UploadedFiles/Birimler/7792/POLAROGRAFI.pdf>-(Erişim tarihi: 20.05.2010)

Anonim 2. Enzimler. www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM//1214/unite09.pdf- (Erişim tarihi: 10.10.2009)

Anonim 3. Biyosensör. sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biyosensor.htm-(Erişim tarihi: 10.04.2009)

Anonim 4. Enstrumental Analiz Ders Notları. www.profdrmehmetyaman.com/ders_notlari/ens_dersnotu.pdf -(Erişim tarihi: 10.08.2010)

Anonim 5. Doğrusal Taramalı Voltametri. http://www.basinc.com/mans/EC_epsilon/Techniques/CycVolt/cv.html-(Erişim tarihi: 10.04.2010)

Anonim 6. Potansiyometri. <http://w3.gazi.edu.tr/~mkaracan/enstrumental/Potansiyometri.ppt>-(Erişim tarihi: 10.08.2010)

Aydoğdu, S. 2007. Gıdalar İçindeki Maltol, Etil Maltol, Vanilin ve Etil Vanilin'in Yapay Sinir Ağları Yöntemi ile Kalibrasyonu Ve Simultane Spektrofotometrik Analizleri, Yüksek Lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 43 s.

Bacocchi, E., Bietti M., Gerini M. F., Lanzalunga O. 2002. The mediation of veratryl alcohol in oxidations promoted by ligninperoxidase: the lifetime of veratryl alcohol radical cation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293: 832-835

Bockris, J.O.M., Reddy, A., 1970. *Modern Electrochemistry*, Vol: 2, London, Mc Donald, Co. Ltd

Cancel, A. M., Orth A. B., Tien.M. 1993. Lignin and Veratryl Alcohol Are Not Inducers of the Ligninolytic System of *Phanerochaete chrysosporium*. *American Society for Microbiology*, 59 (9): 2909-2913

Coulet, P. R.1991. What is a Biosensor? Chapter 1; Biosensor principles and applications. *Marcel Dekker Inc.*, New York. s.1-6.

Crestini, C., Saladino, R. Tagliatesta, P. ve Boschi, T. 1999. Biomimetic degradation of lignin and lignin model compounds by synthetic anionic and cationic water soluble manganese and iron porphyrins. *Bioorg. Med. Chem.*, 7:1897-1905

Dinçkaya, E. 1999. Enzim sensörleri, Biyosensörler, Biyokimya Yaz Okulu Kitabı, s. 81-142

Gündüz, T. 1993. İnrümental Analiz, 3. Baskı. Bilge Yayıncılık, Ankara. 607 s.

Hasançebi, Ö. 2008. Biyosensör Hazırlamada Enzim Kaynağı Olarak Değerlendirilmek üzere Bazı Bitkisel Dokuların İncelenmesi, Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, 64 s.

Have, R.T., Franssen C.R. 2000. On a revised mechanism of side product formation in the lignin peroxidase catalyzed oxidation of veratryl alcohol. FEBS Letters, 487: 313-317

Kawai, S., Umezawa T., Higuchi T. 1986. De Nova Synthesis of Veratryl Alcohol by Coriolus Versicolor. Wood Research, No: 73

Keha, E.E., Kührevioğlu İ. 1993. Biyokimya, 2. Baskı. Derya kitabevi, Trabzon. 552 s.

Kissinger, P.T ve Heineman, W. R. 1983. Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 60(9):699-706

Kolonkaya, N., Sağlam N. 1988. Biyodelignifikasyon ve Biyoteknolojik Önemi. Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi, 3:251-256

Kounaves, S.P. 1997. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Chapter 37 Voltammetric Techniques. Tuft University Department of Chemistry

Lakshminarayanan, V. 2004. Polarography. Resonance :51-61

Lee, K., Moon, S. H. 2003. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. *Journal of Biotechnology*, 102: 261-268

Leisola, M. S. A., Schmidt, B. and Fiechter, A. 1986. Enzymatic Determination of Veratryl Alcohol. *Analytical Biochemistry*. 102: 108-111

Protti, P. 2001. Introduction to Modern Voltammetric and Polarographic Analysis Techniques. *Amel electrochemistry* IV Edition

Schoemaker, H. E., K. Piontek. 1996. On the interaction of lignin peroxidase with lignin. *Pure & Appl. Chem.*, 68 (11): 2089-2096

Sezgin, İ.V. 2006. Lignin İçin Model Bir Bileşik Olan 3,4-Dimetoksibenzil Alkolün Demir Porfirin Katalizörlüğünde Oksidasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 55 s.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition, Part 5000 Aggregate Organic Constituents.

Telefoncu, A. 1999. Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu-Biyosensörler. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir. s.1-2

Tien, M., Kirk, T.T. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 2280-2284

Turner, A.P.F. 1987. "Biosensors: Fundamentals and Applications", Oxford University Press, Oxford. S. 5-7.

Türkdemir, H. 2008. Enstrumental analiz ders notları II

Uğurlu, M. 2003. Kâğıt endüstrisi atık sularından lignin ve fenolün perlit minerali ile giderimi, *Çev. Kor. Dergisi*, 12(47): 11-16

Üner, B. 2003. Kraft hamurundan kalıntı ligninin izole edilmesi ve yapısı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2: 83-100

Wang, J. 2006. Analytical Electrochemistry. A John Wiley & Sons, INC., Publications

Weng, j. K., X. Li., 2008. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Current opinion in biotechnology*, 19:166-172

Yıldız, A., Genç, Ö. 1993. Enstrumental Analiz. *Hacettepe Üniv. Yayınları*, 1.Baskı , S: 352.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Adem SARIHAN
Doğum Yeri ve Tarihi : Kaynarca / 21.12.1985
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurumu ve Yılı)
Lise : Beyoğlu Güner Akın Lisesi (YDA)
Lisans : U.Ü. Fen-Edebiyat fak. Kimya Bölümü
Yüksek Lisans : U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya
Anabilim dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Bilecik Üniversitesi Fen-Edebiyat
Fakültesi Kimya Bölümü / (03.02.2010-)

İletişim (e-posta) : adem.sarihan@bilecik.edu.tr
Yayımları :

1- Ş. Şenol, A. Sarihan, M. H. Türkdemir, ‘‘HF çözeltileri için, sızdırmaz Ag/AgCl referans elektrot hazırlanması’’ 8th International Electrochemistry meeting, Antalya (2009) (Poster bildiri)

2- A. Sarihan, Ş. Şener, M. H. Türkdemir, ‘‘Veratril Alkol ve Veratril Aldehitin Voltametrik olarak yan yana Analizlenebilirliği’’ 5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Erzurum (2010) (Poster bildiri)

3- Ş. Şenol, A. Sarihan, M. H. Türkdemir, ‘‘Oksalik Asitin Voltametrik Davranışının İncelenmesi’’ 5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Erzurum (2010) (Poster bildiri)