

**TRİPTOFAN TESPİTİ İÇİN MOLEKÜLER
BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ
KUVARS KRİSTAL MİKROTERAZİ
NANOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

Abdulkadir ÜNÜVAR

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Prof. Dr. İbrahim YILMAZ

Şubat-2017

T.C
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRİPTOFAN TESPİTİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER
TEMELLİ KUVARSA KRİSTAL MİKROTERAZİ NANOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Abdulkadir ÜNÜVAR

Anabilim Dalı: Kimya

Programı : Analitik Kimya

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim YILMAZ

KARAMAN-2017

TEZ ONAYI

Abdulkadir ÜNÜVAR tarafından hazırlanan “Triptofan tayini için moleküler baskılanmış polimer temelli kuvars kristal mikroterazi nanosensör geliştirilmesi”adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Prof. Dr. İbrahim YILMAZ

Juri Üyeleri

Prof. Dr. İbrahim YILMAZ
(Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fak.
Kimya Bölümü)

Prof. Dr. Bedrettin MERCİMEK
(Necmettin Erbakan Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fak.
Kimya Eğitimi Bölümü)

Yrd. Doç. Dr. Aytac GÜLTEKİN
(Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Mühendislik Fak.
Enerji Sistemleri Mühendisliği Bölümü)

İmza:







Tez Savunma Tarihi: 03/02/2017

Yukarıdaki sonucu onaylarım


Doç. Dr. Ahmet İPEK
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Abdulkadir ÜNÜVAR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TRİPTOFAN TESPİTİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ KUVARSA KRİSTAL MİKROTERAZİ NANOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Abdulkadir ÜNÜVAR

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim YILMAZ

Şubat, 2017, 55 sayfa

Sunulan çalışmanın amacı, triptofan tayinine yönelik moleküler baskılanmış polimer (MIP) temelli kuvars kristal mikroterazi (QCM) nanosensör geliştirilmesidir. QCM nanosensör, 2-metakriloamidohistidin-Cu(II) [MAH-Cu(II)]-Triptofan ön organize monomer sistemini kullanarak nanomolar seviyelerinde triptofanı tanıyan belleklerin, QCM elektrot yüzeyinde oluşturulmasıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan ön organize monomer sistemi, Fourier Transform Infrared (FTIR) ile QCM nanosensör ise Atomik Kuvvet Mikroskopuyla (AFM) karakterize edilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarının ardından baskılanmış ve baskılanmamış sensörler QCM sistemine bağlanarak; hedef moleküle bağlanma çalışmaları, seçicilik çalışmaları ve gerçek numunelerde hedef molekülün tayin çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar, baskılanmış QCM nanosensörün triptofan için yüksek seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Triptofan, Kuvars Kristal Mikroterazi, Moleküler Baskılama, Nanosensör.

ABSTRACT

Ms Thesis

DEVELOPMENT OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER BASED QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE NANOSENSOR FOR THE DETERMINATION OF TRYPTOPHAN

Abdulkadir ÜNÜVAR

Karamanoğlu Mehmetbey University

**Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim YILMAZ

February, 2017, 55 Pages

The aim of this study is the preparation of quartz crystal microbalance (QCM) nanosensor for the detection of amount of tryptophan. QCM nanosensor was prepared by formation of tryptophan memories on the gold surface of QCM electrode by using Methacryloylamidohistidine-Cu(II) [MAH-Cu(II)]-tryptophan pre-organized monomer system. The designed pre-organized monomer system was characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR) and QCM nanosensors was characterized by Atomic Force Microscope (AFM). After the characterization studies, imprinted and non-imprinted sensors were connected to QCM system for studies of connection of the target molecule, selectivity and the detection of amount of target molecule in real samples. The results showed that the imprinted QCM nanosensor has high selectivity for tryptophan.

Keywords: Tryptophan, Quartz crystal microbalance, Molecular imprinting, Nanosensor.

ÖN SÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim süresince yardımlarından dolayı danışmanım Sayın Prof. Dr. İbrahim YILMAZ'a, çalışmalarım sırasında her türlü desteği vererek beni yönlendiren Sayın Yrd. Doç. Dr. Aytaç GÜLTEKİN, Sayın Arş. Gör. Gamze KARANFİL CELEP ve Sayın Arş. Gör. Ş. Nihan Karuk ELMAS'a çok teşekkür ederim. Ayrıca tez süresince desteğini her an hissettiren aileme ve sevgili eşim Havva Esmâ ÜNÜVAR'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Abdulkadir ÜNÜVAR

Şubat, 2017

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖN SÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Triptofan	5
2.2. Sensörler	5
2.2.1. Nanosensörler	7
2.2.2. Gravimetrik Sensörler.....	7
2.2.2. Piezoelektrik Etki.....	7
2.3. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM)	9
2.4. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP)	12
2.4.1. Moleküler Baskılama Tekniği	13
2.4.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri.....	14
2.4.2.1. Kovalent Baskılama.....	14
2.4.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama	15
2.4.3. Moleküler Baskılamanın Temel Bileşenleri	16
2.4.3.1. Kalıp (Hedef) Molekül.....	16
2.4.3.2. Fonksiyonel Monomerler.....	16

2.4.3.3. Çözücü	18
2.4.3.4. Çapraz Bağlayıcılar.....	18
2.4.3.5. Başlatıcılar	19
2.5. Adsorpsiyon	20
2.5.1. Adsorpsiyon Oluşum Mekanizmaları	20
2.5.2. Adsorpsiyon İzotermi	20
2.5.2.1. Scatchard Analizi	21
2.5.2.2. Langmuir Analizi	22
2.6. Kaynak Özetleri	23
2.6.1. Triptofan Tayini ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	23
2.6.2. Kuvars Kristal Mikroterazi Yüzeyinde Moleküler Baskılanmış Polimer Tekniğine Dayalı Çalışmalar	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	27
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	27
3.3. Metakrilamidohistidin (MAH) Monomerinin Sentezi.....	27
3.4. Metakrilamidohistidin-Cu(II) [MAH-Cu (II)] Metal-şelat Monomerinin Sentezi ..	28
3.5. Metakrilamidohistidin-Cu(II)-triptofan [MAH-Cu(II)-triptofan] Metal-şelat Monomerlerinin Ön Organizasyon Çözeltilerinin Hazırlanması	28
3.6. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrotun Hazırlanması	29
3.7. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrot ile Sensör Ölçümleri	31
3.8. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrot ile Seçicilik Çalışmaları	31
3.9. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrot ile Gerçek Numunelerde Triptofan Miktar Tayini.....	32

4. BULGULAR	33
4.1. MAH, MAH-Cu(II) Monomerlerinin ve MAH-Cu(II)-triptofan Kompleksinin Karakterizasyonu.....	33
4.2. Triptofan Baskılı QCM Elektrotun Yüzey Karakterizasyonu	35
4.3. Ligand Etkileşimi Aracılığıyla Triptofan Baskılı QCM Nanosensörlerin Bağlama Etkileşimlerinin Ölçümü	39
4.4. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrotun Seçiciliği	43
4.5. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrot ile Gerçek Numunelerde Triptofan Tayini..	44
4.6. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrotun Analitik Performans	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6. KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1: Moleküler baskılı polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler.....	17
Çizelge 2.2: Moleküler baskılı polimer sentezinde yaygın olarak kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar	19
Çizelge 4.1: Triptofan baskılı QCM nanosensörün Langmuir ve Scatchard analizlerinin karşılaştırılması.....	42
Çizelge 4.2: Triptofan baskılı polimerin seçiciliği	44
Çizelge 4.3: Gerçek numune analiz sonuçları	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Triptofanın kimyasal yapısı	5
Şekil 2.2: Sensörlerin genel gösterimi.....	6
Şekil 2.3: Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi	8
Şekil 2.4: AT kesim kuvars kristal	9
Şekil 2.5: Disk biçimindeki kuvars kristalin ve elektrotları arasında oluşan kararlı dalganın $n=1$ için gösterimi.....	10
Şekil 2.6: Moleküler baskılı polimer hazırlama aşamaları.....	14
Şekil 2.7: Scatchard grafiği	21
Şekil 3.1: MAAH-Cu(II)-Triptofan yapısı	28
Şekil 3.2: QCM nanosensör yüzeyindeki triptofan bellek oluşumu.....	30
Şekil 3.3: Kuvars kristal mikroterazi.....	31
Şekil 4.1: MAH monomerinin FTIR spektrumu	33
Şekil 4.2: MAH-Cu metal şelat monomerinin FTIR spektrumu	34
Şekil 4.3: MAH-Cu(II)-triptofan kompleksinin FTIR spektrumu.....	35
Şekil 4.4: QCM elektrotun altın yüzeyinin AFM görüntüsü.....	36
Şekil 4.5: Allil merkaptan ile modifiye edilmiş QCM elektrotun altın yüzeyinin AFM görüntüsü.....	37
Şekil 4.6: Polimerleştikten sonra QCM elektrotun altın yüzeyinin AFM görüntüsü.....	38
Şekil 4.7: Triptofan baskılanmış ve baskılanmamış nanosensör frekans değerleri.....	40
Şekil 4.8: Triptofan baskılı polimerin Scatchard eğrisi.....	41
Şekil 4.9: Triptofan baskılı polimerin Langmuir eğrisi.....	42
Şekil 4.10: (a) Triptofan (b) Fenil alaninin kimyasal yapısı	43
Şekil 4.11: Triptofan baskılı sensörün triptofan ve fenil alanin için frekans değerleri (100 μ M için)	43
Şekil 4.12: Triptofan baskılı sensör için kalibrasyon grafiği	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
A	Kuvars kristal yüzey alanı
b	Langmuir sabiti
C	Serbest triptofan derişimi
f_c	Kuvars kristal ve yüzeyde oluşan film tabakası ile osilasyon frekansı
f₀	Kuvars kristal rezonans frekansı
Δf	Frekans değişimi
K_D	Ligand-değişim temelli metal-şelat kopolimerinin ayrışma sabiti
ΔM	Eklenen kütle
ρ_q	2,648 g/cm ³ kuvars kristal yoğunluğu
Q	Polimere bağlanan triptofan miktarı
Q_{max}	Bağlanma bölgelerinin maksimum sayısı
μ_q	2,947x10 ¹¹ g/cm.s ² AT kesim kuvars kristal için shear modulus katsayısı
nM	Nanomolar

Kısaltmalar**Açıklama**

ADV	2,2-azobis (2,4-dimetilvaleronitril)
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
AIBN	2,2-azobis (izobütironitril)
BPO	Benzoil peroksit
DVB	Divinil benzen
EDMA	Etilen glikol dimetakrilat
FTIR	Fourier transform kızılötesi spektrometresi
MAH	Metakrilamidohistidin
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
QCM	Kuars kristal mikroterazi
Trp	Triptofan

1. GİRİŞ

Triptofan, proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Triptofan, insan vücudunda çok çeşitli fizyolojik rolleri olan temel bir amino asittir (Mazloun-Ardakani ve ark., 2011). Beslenme açısından dışarıdan alınması zorunlu (esansiyel) olan amino asitlerdendir. Ayrıca, vücut için gerekli olmayan amino asitlerin sentezi için de gereklidir. Triptofan nörotransmitter serotonin (5-hidroksitriptamin) dahil olmak üzere, vücutta birçok önemli maddelerin üretimi için ihtiyaçtır. Ayrıca biyolojik işlemlerde örneğin, protein sentezinde, hayvan büyümesinde ve bitki gelişiminde önemli bir rol oynar (Diem ve ark., 2000; Miller ve ark., 2003; Von Nussbaum, 2003; Ackay ve ark., 2006). Triptofan aynı zamanda protein aktivitesini, hidrofobikliği ve çeşitliliği belirleyen en önemli etkenlerden biridir (Friedman ve Cuq, 1988; Budisa ve ark., 2002). Triptofan proteinlerin önemli bir bileşenidir ve insan beslenmesinde pozitif azot dengesinin kurulması ve korunmasında çok gereklidir (Fiorucci ve ark., 2002). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ya göre, triptofan gereksinimi günde vücut kilogramı başına 4mg'dır. Serotonin hormonu "mutluluk hormonu" adıyla bilinen ve ruh halimizi çok etkileyen bir hormondur. Serotonin geliştirmekte olan beynin bazı bölgelerinin serotonerjik büyümesini, olgunlaşmasını düzenler ve hipofiz büyüme hormonunun salgılanmasını etkiler (Whitaker-Azmitia ve ark., 2005). Serotonin, stres azaltmada ve saldırganlığın üstesinden gelmede önemli rol oynar. Serotonin seviyesinin artmasıyla iştah oranı azalmaktadır. Triptofan iştah azaltıcı özelliğinden dolayı kilo kontrolü uygulamalarında kullanılabilir. Günümüzde yapılan çalışmalar sonucunda depresyon, migren, obsesif kompulsif bozukluk, obezite, insülin direnci, fibromiyalji ve hiperaktivite gibi birçok hastalığın temelinde serotonin eksikliği olduğu düşünülmektedir. Burada serotonin seviyesini, triptofan ayarlamaktadır. Serotonin hormonunun üretimini arttıran kimyasallardan biri de triptofandır. Triptofan vücutta üretilmez ve dışarıdan alınır. L-Triptofan doğada enantiomer yapıdadır. İnsan organizması tarafından sentezlenemediği için sadece diyet yoluyla alınan temel bir amino asittir. Triptofan içeren besinler ise hindi, yumurta, badem, tavuk, soya, süt ve süt ürünleri, keçi peyniri, mandalina, muz, kakao, parmesan peyniri, susam, fıstık, biftek, un, kahvaltılık tahıllar ve tatlılardır (Moranta ve ark., 2014).

Serotonin ve melatonin seviyesinin düşük olduğu durumlarda, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları görölmektedir. Serotonin ve melatonin seviyelerinin düşük olduğu durumlarda ayrıca uzun süreli depresyon ve ensefalopati de görölür. Triptofan gerektiği kadar metabolize olmadığında, beyinde zehirli bir atık ürün oluşturarak halüsinasyonlara ve hezeyanlara neden olur (Kochen ve ark., 1994; Fiorucci ve ark., 2005). Triptofan serotoninin öncüsüdür.

Triptofan eksikliği, beyinde halüsinasyon, hezeyan ve şizofrene neden olan toksik ürünlerin birikmesine neden olmaktadır (Goyal ve ark., 2011). Triptofan aşırı dozda uyuşukluk, bulantı, baş dönmesi ve iştah kaybı yaratır. Kandaki triptofan seviyesi beyinde serotonin ve melatonin seviyesi ile ilgili olduğu kadar aynı zamanda plazmada karaciğer hastalığı ile de ilgilidir (Fan ve ark., 2011). Bu nedenle, triptofan anksiyete olan yani endişe ve kaygılı insanlar için çok önemlidir. Aynı zamanda, uyku yardımcısı, nutrasötik ve antidepresan olarak kullanılır (Shahrokhian ve ark., 2011). Triptofan organizma tarafından sentezlenemediği için vazgeçilmez aminoasitlerden biridir. Triptofan çoğunlukla bitkilerden ve şikimik asit içeren organizmalarda sentezlenir. Triptofan konsantrasyonu beynin biyokimyasal dengesini izlemek için hassas bir parametredir.

Triptofan, serotonin ve melatonin gibi sinir ileticileri için hayati öneme sahip bir maddedir. Bu tip kimyasal taşıyıcılar sayesinde vücudumuzda bulunan sinirler bir hücreden diğerine taşınırlar. Dolayısıyla bu taşıyıcılar vücudumuzda yeterli miktarda olmadığı zaman, beyin fonksiyonlarını doğru şekilde yerine getiremez. Triptofan, serotonin ve melatoninin üretimine yardımcı olduğundan, vücudumuzun triptofan içeren besinlerden ya da triptofan desteklerinden yeterli miktarda almasının yaşamsal önemi bulunmaktadır. Bundan dolayı farklı besin gıdalarında triptofan tayini ve miktarının belirlenmesi için basit, hızlı, ucuz ve doğru bir metot geliştirmek önemlidir.

Günümüzde triptofan miktarının belirlenmesi için, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Lian ve ark., 2012), floresan dedektörlü HPLC ([Zhang ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2012]), sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometri (Zhu ve ark., 2011), spektrofotometri (Li ve ark., 2010), spektroflorimetri (Reynolds ve ark., 2013), kapiler elektroforez tekniği (Malone ve ark., 1995) ve kızılötesi optik sensör (Huang ve ark., 2011) gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler kantitatif analiz için çok önemli olmasına rağmen çoğu yüksek maliyetler, karmaşık analiz süreci, uzun analiz süresi, optimizasyon şartlarının uzun olması ve analizcinin yeteneğine bağlı olan değişkenler gibi dezavantajlara sahiptir.

Kuvars kristal mikroterazi (QCM); kütle farklılıklarını, elektriksel bir sinyale dönüştürebilen bir tekniktir. Bu teknik yüksek frekanslı ve yüzeyinde meydana gelen kütleli değişikliklere oldukça hassas olan bir yöntemdir. QCM cihazı basit, ucuz, etkili, az yer kaplayan ve yüksek hızda kütle değişikliğine duyarlı olması gibi üstün özelliklerinden dolayı, son yıllarda biyokimya, çevre, gıda ve klinik uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. QCM cihazının herhangi bir kimyasal yapı için seçiciliğe sahip olmamasından dolayı, bir moleküle dayalı seçicilik elde edebilmek için kuvars kristal yüzeyi çeşitli kimyasallar ve biyo-moleküller ile modifiye edilir. Kuvars kristal mikroterazi yüzeyinde seçici bir polimer tabakası elde edebilmek için kullanılan en etkili tekniklerden birisi moleküler baskılama tekniği ile polimerler sentezlemektir.

Moleküler baskılama tekniği, spesifik tanıma bölgeleri ile şablon molekülün mevcudiyetinde polimerizasyon ile bir polimer matrisi içinde oluşturulmuş olan molekül algılama ve tanıma alanı olan yararlı bir tekniktir.

Moleküler olarak baskılı polimerler bir fonksiyonel monomer, bir şablon molekülü ve bir çözücü varlığında fazla miktarda çapraz bağlayıcının kopolimerize edilmesiyle hazırlanmaktadır. Aynı zamanda moleküler baskılama tekniği, üzerinde hedef (kalıp) molekülü tanıma özelliği taşıyan boşluklar içeren polimerlerin sentezlenmesi işlemine dayanmaktadır. Oluşan bu boşluklar hedef molekülün büyüklüğünü ve şeklini tanırlar. Hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılması ile birlikte sabit pozisyonlarda fonksiyonel monomerleri ortaya çıkarmaktadır. Bu olay sayesinde hedef molekülüne eşlenik yapı meydana gelmektedir. Bu işlemler sonucu oluşan polimerler, hedef molekülün yapısını, boyutunu ve fizikokimyasal niteliklerini tanımaktadırlar.

Hedef molekül için benzersiz bir seçiciliğe sahip olan moleküler baskılanmış polimerler (MIP) mekanik bir etkiye, ısıya, asite, baza, suya ve organik çözücülere karşı direnç gösterirler (Wulff ve ark., 1977). Bu polimerlerin elde edilme yöntemleri basit ve ucuz olup, birkaç yıl boyunca performanslarında herhangi bir değişim olmaksızın saklanabilirler. Bu özellikleri sayesinde moleküler baskılanmış polimerler yaşam, farmasötik ve doğa bilimleri gibi geniş bir alanda kullanılabilirler.

Nanomolar gibi çok seyreltik numuneleri algılayabilmek için moleküler baskılanmış polimerler kuvars kristal mikroterazi yüzeyinde nanometre kalınlığında sentezlenebilmektedir (Gültekin, 2009).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın temelini, farklı besin gıdalarında triptofan miktarının belirlenmesi için iki farklı metal şelat monomeri kullanarak kuvars kristal mikroterazi cihazında moleküler baskılanmış polimerler temelli nanosensör geliştirilmesi oluşturmaktadır. Yapılacak olan çalışmanın avantajları arasında, yöntemin maliyetinin düşüklüğü, yöntemin hızlılığı, analiz prosedürlerinin azlığı, fazla yer kaplamaması ve tekrar kullanılabilirliği gibi özellikleri sayılabilir. Ayrıca bu çalışma, triptofan tespiti ve miktarının belirlenmesi için yeni ve kullanışlı bir metot oluşturma imkanı sağlayacaktır.

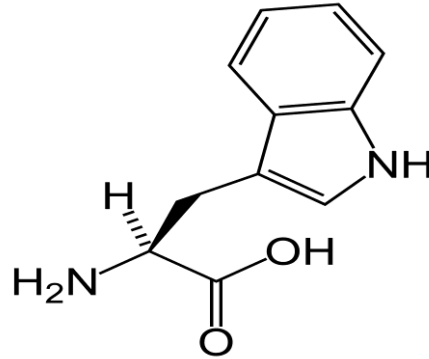


2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Triptofan

Sistemik adı (S)-2-Amino-3-(1H-indol-3-il)-propiyonik asittir. Kısaca Trp olarak gösterilir. Kimyasal formülü $C_{11}H_{12}N_2O_2$ olup (Şekil 2.1), molekül ağırlığı 204,225 g/mol'dür. Erime noktası 289°C, yoğunluğu 1,34 g/cm³'tür. İzoelektrik noktası pH 5,89 ve pKa'sı 2,38 ve 9,34'tür.

Proteinleri oluşturan 20 amino asitten biri olan triptofanın genetik kodu UGG olup, nonpolar bir amino asittir. L- Triptofan β -Karbon üzerinde süstitüe indol halkası içeren alanin türevi bir esansiyel amino asittir. Bu süstitüe indol halkaları, biyokimyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Triptofan esansiyel bir amino asit olduğu için insan vücudu tarafından sentezlenemeyen amino asitler gurubuna girer. Bu yüzden bu amino asitin beslenme yoluyla dışardan vücuda alınması gerekmektedir. Glukojenik ve ketojenik bir amino asit olan triptofan piruvat ve asetil KoA üzerinden yıkılır. Yapısında indol halkası bulunur. Bu indol halkası serotonin ve melatonin çeşitli bileşiklerin yapısına katılır. Karaciğerde triptofan yıkımı ile nikotinik asit sentezlenir.

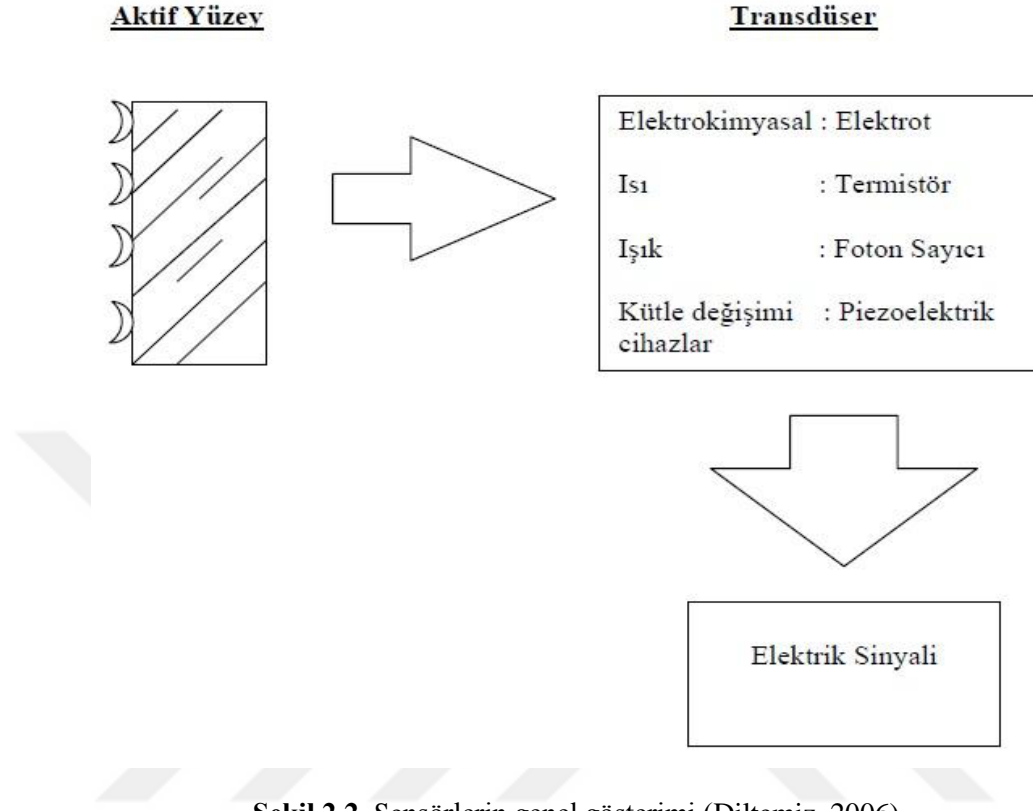


Şekil 2.1. Triptofanın kimyasal yapısı

2.2. Sensörler

Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte çevre, gıda ve biyoloji alanındaki gelişmeler yüksek seçiciliğe sahip sensörlerin kullanım alanlarını artırmaktadır. Sensör ya da algılayıcı, bilimsel disiplin alanlarının bilgilerinden faydalanılıp moleküllerin veya düzeneklerin algılama yetenekleri ile günümüz elektronik yöntemlerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan analitik cihazlar şeklinde açıklanabilir. Sensörler, analit ile etkileşime giren aktif bir bileşenin kombinasyonu ile oluşturulur.

Bu kombinasyon, meydana gelen etkileşim sonucunda oluşan sinyali ileten ve bu sinyali ölçen bir sistem içerir (Wang, 1997). Sensörlerin genel gösterimi Şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2. Sensörlerin genel gösterimi (Diltemiz, 2006)

Sensörlerin görevi, fiziksel ortam ile elektronik cihazları birbirine bağlamaktır. Sistemdeki sensör veya sensör grupları yapısı, hangi değişkene duyarlı ise sistem dışındaki değişkeni algılar ve elde ettiği değerleri sistemin karar verme birimine yollar. Yani sensör, sisteme giren girdi miktarına yanıt olarak gelen sinyalleri çıkarır. Çıkış sinyali genellikle elektrikseldir.

Sensörler belirli bir analiz için kullanılır. Kullanılan bu sensörlerin uygunluğuna katkıda bulunan faktörler, fiziksel özellikler veya numune matrisinden doğan kimyasal girişimler içerebilir. Sensörler bazı durumlarda idealden saparlar. Örneğin bir analizde belirli bir analiti belirlemek için etkili bir performans özelliği olan sensör, farklı ortamlarda aynı analiti saptayamayabilir (Gültekin, 2009).

2.2.1. Nanosensörler

Nano boyuttaki malzemeleri ya da molekülleri algılamak için yapılan sensörlere nanosensör denilmektedir. Gerek yapılan sensörün kalınlığının nano boyutta olması gerekse algıladığı molekülün nM seviyelerinde olması nedeniyle sensör nanosensör olarak adlandırılmaktadır (Gültekin, 2009).

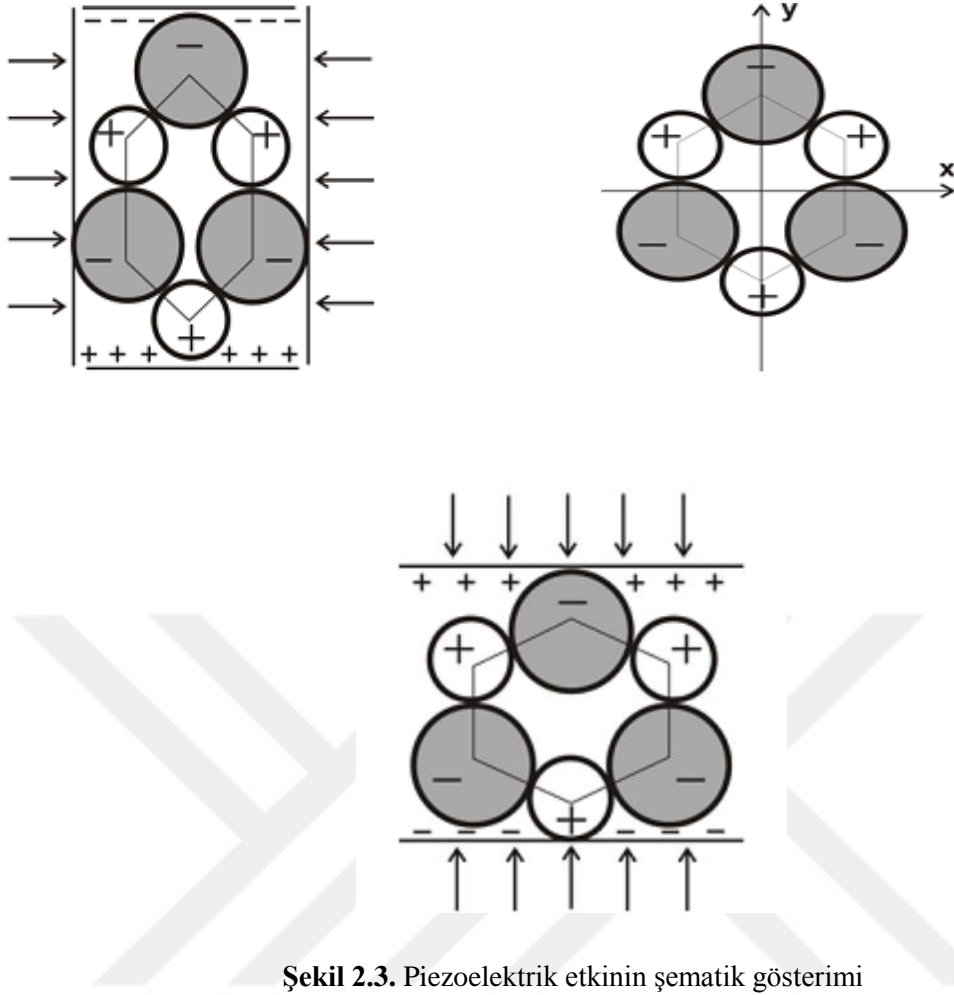
2.2.2. Gravimetrik Sensörler

Yüzeyindeki nanogram seviyelerinde kütle farklılıklarını hassas bir şekilde ölçebilen son derece üstün özellikleri bulunan yüzey sensörlerine gravimetrik sensörler denir. Kütle farklılıklarına hassas olan bu sensörlerin özelliği, asimetrik kristallerde bulunan piezoelektrik etkiye sahip olmalarıdır (Ralf ve ark., 2000).

2.2.2. Piezoelektrik Etki

Piezoelektrik kelimesi Latince bastırmak-press anlamındaki “piezo” ön ekinden türetilen bir kavramdır. Bu kavramın ilk defa ispatı Pierre Curie ve Jacques Curie kardeşler tarafından 1880 yılında ortaya atılmıştır. Piezoelektrik kavramı, bazı kristal ve seramik maddeler üzerine, mekanik bir kuvvet uygulandığında bir elektriksel potansiyel meydana gelmesi olarak tanımlanabilir (Rodoplu, 2011). Aynı zamanda kristale potansiyel bir güç verildiğinde, kristal üzerinde bozulmalar olur. Böyle bir kristal bir elektrik düzeneğine yerleştirilirse, kristalin kütesine ve şekline bağlı olacak şekilde sabit frekansta titreşim meydana getirir (Yao, 1997). Bu özellikler sayesinde duyarlı kütle sensörler yapılır.

Şekil 2.3'te piezoelektrik etkinin şematik gösterimi verilmektedir. Burada x-ekseni doğrultusunda piezoelektrik etkiye sahip olan kuvars kristalinin deformasyonu ve y-ekseni doğrultusunda oluşan yük değişimi (polarizasyon) gösterilmiştir (Schäfergen, 2004)

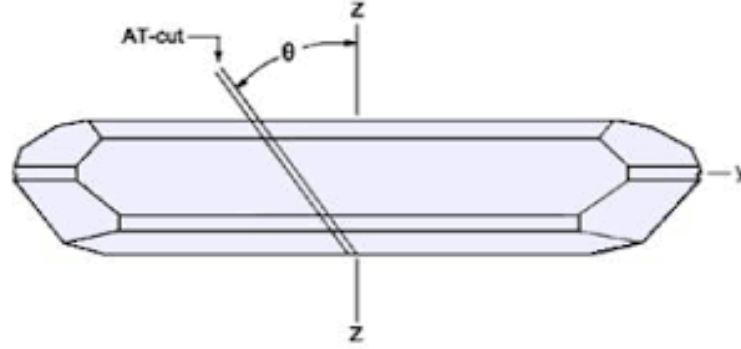


Şekil 2.3. Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi

Piezoelektrik özellik gösteren farklı türde kristaller olsa da analitik uygulamalarda kuvars kristaller tercih edilir. Kuvars kristal kullanılmasının sebebi, bu kristallerin sahip oldukları fiziksel, kimyasal ve elektriksel özellikleridir. Kuvars çok ince kesilir ve elektrotları iki yüzüne termal buharlaştırma yoluyla altın, gümüş, platin, nikel ve alüminyum gibi metaller ile kaplanır. Analitik uygulamalarda genellikle altın elektrot kullanılır. Bunun sebebi altının inert özelliğidir. Metal miktarı ile kristalin çalışma frekansı ayarlanmaktadır. Çalışmalarda kullanılan kristallerin boyut aralığı 10-16 mm, kalınlığı ise yaklaşık 0.15 mm olmaktadır. Ayrıca bu kristallerin şekilleri disk, kare veya dikdörtgen olabilmektedir (Sözmen, 2008).

Kristalin kimyasal yapısı, şekli, kristalin kesimi, boyutu ve kütlesi kristalin doğal titreşim frekansını etkilemektedir (Heising, 1946). AT ve BT kesim kristalleri olarak bilinen iki kesme tipinde kristal vardır. Bu kristallerin kesme açıları farklıdır. Her ikisi de z ekseninden kesilen kristallerin kesme açıları AT kesim için $+35^{\circ}15'$, BT kesim için ise $-49^{\circ}00'$ dir (O' Sullivan ve Guilbault, 1999).

AT kesimli kristaller piezoelektrik uygulamalarında kullanılır. Bu kuvars kristalinin kullanım nedeni oda sıcaklığına yakın sıcaklıklarda neredeyse sıfır frekans değişimine sahip olmasıdır. Şekil 2.4'te AT kesimli kuvars kristal düzlemi gösterilmiştir.



Şekil 2.4. AT kesim kuvars kristal (Kanazawa ve Cho, 2009)

Kuvars kristal mikroterazi, piezoelektrik etki gösteren sensörlerin uygulama alanlarından birisidir.

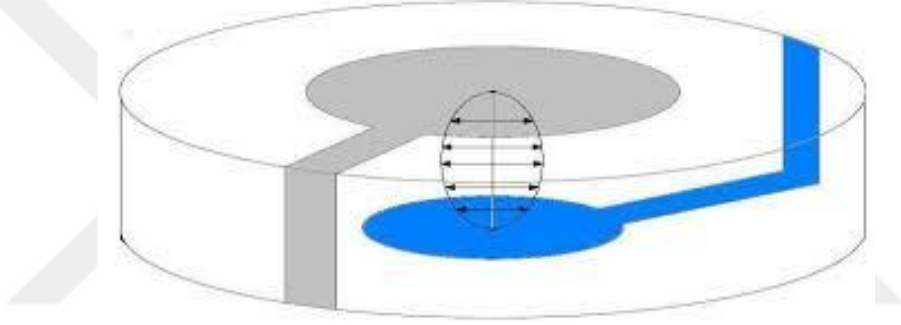
2.3. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM)

Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM), kütle algılayıcı bir sensör olup, kütle farklılıkları elektriksel sinyale çeviren bir cihazdır. Oldukça hassas bir sensör olup, frekansın çıkış sinyaline dönüşümü oldukça basittir. Kuvars kristal mikroterazi, piezoelektrik özellikli rezonatördür. Kuvvet uygulandığında elektrik, elektrik uygulandığında ise fiziksel boyutlarda değişim (burkulma) oluşmaktadır. Kuvars kristal mikroterazi piezoelektrik etkiye sahip özel bir biçimde kesilmiş kuvars kristal içerir. Ayrıca bu cihaz farklı sensör uygulama alanlarında kullanılmakta olup; yüksek frekanslı, yüzeyindeki kütle farklılıklarına hassas bir cihazdır. Kuvars kristal mikroterazinin ilk kez kullanımı 18. yüzyılın başlarına dayanır. İlk olarak kalitatif tayinler için kullanılmıştır. Kantitatif tayinler için kullanımı ise Sauerbrey (1959) denkleminde sonra olmuştur. QCM, elektrokimyasal prosedürler esnasında oluşan kütle farklılıklarını, basitçe ölçülebilen bir sinyal olan, rezonans frekansında sapmaya dönüştürürler. Elektrokimyasal tepkime esnasında yüksek kütle hassasiyeti göstermeleri, bu cihazları farklı kılan bir özelliktir.

QCM özel şekilde kesilmiş piezoelektrik özellik gösteren kuvars kristaller içerir. Kuvars kristal mikroterazi; kuvars elektrot, osilatör devresi ve PC yüzeyler arası frekans sayıcıdan meydana gelir. Kuvars kristal mikroterazi alternatif yüksek akıma maruz kalınca, mekanik rezonans modunda titreşim yapar. Kütle duyarlılığı kristalin toplam kütlesi üzerindeki osilasyon frekansına bağlı olarak ortaya çıkar.

Çözelti ile etkileşimde bulunan kuvars kristal rezonatörü oldukça hassas sinyal veren bir elektronik devreye bağlıdır. Rezonatör üzerinde meydana gelen bir farklılık osilasyon frekansında ani bir değişikliğe sebep olur.

Bir piezoelektrik özellikli kuvars kristal rezonatörü, kuvarstın tek kristalinden kesilmiş bir parçadır. Kristalin elektrotları arasına değişken potansiyel farkı uygulandığında PQC’de bir alternatif elektrik alanı oluşur. Uygulanan bu potansiyel farkı ile kristal örgünün fiziksel özelliği bozulur. Bu durum kristal diskin içinde karakteristik titreşim frekansında kararlı dalga oluşmasına sebep olur (Şekil 2.5). Salınımın doğrultusu, kristal örgünün elektrik alan içindeki düzenlenimine bağlıdır. Kalınlık kesme modundaki (thickness shear mode, TSM) salınım, kuvars alttaşın yüzeyine paralel bir yer değiştirme oluşturur. Bu salınım sadece elektrotlar arasındaki bölgede gerçekleşir. Dolayısıyla sadece elektrotlar arası bölge piezoelektriksel olarak aktiftir.



Şekil 2.5. Disk biçimindeki kuvars kristalin ve elektrotları arasında oluşan kararlı dalganın n=1 için gösterimi(Karanfil, 2013)

Elektrotlar arası bölgede oluşan kararlı dalga Şekil 2.5’te görülmektedir. Gri renkli elektrot kristalin üst yüzeyinde, mavi renkle gösterilen elektrot ise kristalin alt yüzeyindedir. İki elektrot arasındaki hacimde parçacıklar +x ile -x doğrultusunda hareket ederken, dalga hareketi +y ile -y doğrultusunda yani elektrot düzlemine dik doğrultudadır.

$$L = n \cdot (\lambda_n / 2) , (n=1,2,3,\dots,n) \quad (2.1)$$

λ_n Eşitlik 2.1’den çekilirse;

$$\lambda_n = 2L/n \quad (2.2)$$

$$f_n = V/\lambda_n = nV/2L \quad (2.3)$$

n=1 için temel frekans f_1 olduğuna göre, n=n için rezonans frekansı $f_n = n \cdot f_1$ dir.

Kararlı dalga oluşturmak, her frekansta mümkün olmayabilir. Kararlı dalga oluşturmak için titreşim frekansı, kaynağın frekansı ile aynı olmalıdır. Dolayısı ile üretilen dalgalarla kaynak rezonans halinde olmalıdır. Titreşiciyi sadece temel frekansıyla değil tek (1,3,5,...) harmonikleriyle de uyarmak mümkündür.

Kristalde kalınlık (L) arttıkça frekans azalır. Frekansı yüksek kuvars kristal elde edebilmek için kristal daha ince kesilmelidir. Bu yüzden kristal kalınlığı belirli seviyelere kadar düşürülebilir. Yaygın olarak kullanılan kuvars kristaller 5 MHz, 10 MHz ve 30 MHz'lik kuvars kristallerdir (Karanfil, 2009).

İlk defa Lord Rayleigh tarafından mekanik olarak rezonans halinde olan kristalin kütledeki değişimin, kristalin rezonans frekansını değiştirdiği ortaya atılmıştır. Şekil 2.5'te gösterildiği gibi elektrotların arasındaki bölgenin dışında dalga hareketi olmayacağı için sadece elektrot yüzeyinde oluşan kütle değişimleri kristalin titreşimini etkiler (Rodoplu, 2011).

Elektrot üzerindeki kütle birikiminin meydana getirdiği frekans değişikliği Sauerbrey denkleminde elde edilir. Bu denklem, 1959 yılında G. Sauerbrey tarafından piezoelektrik özellikli kristallerin üzerine bağlanan kütlenin değişimini osilasyon frekansı ile ilişkilendirmek için oluşturulmuştur (Srivastava, 2001).

Sauerbrey denklemi:

$$\Delta f = f_c - f_0 = \frac{2f_0^2 \Delta M}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}} \quad (2.4)$$

f_c = Kuvars kristal ve yüzeyde oluşan film tabakası ile osilasyon frekansı

f_0 = Kuvars kristal rezonans frekansı

ΔM = Eklenen kütle

ρ_q = 2,648 g/cm³ kuvars kristal yoğunluğu

μ_q = 2,947x10¹¹ g/cm.s² AT kesim kuvars kristal için shear modulus katsayısı

$\Delta f = f_c - f_0$ = Frekans değişimi

A = Kuvars kristal yüzey alanı

Sauerbrey denklemi; K bir sabit sayı olacak şekilde yazılırsa,

$\Delta m = -K \cdot \Delta f$,

$\Delta f = f_c - f_o$, için

$\Delta m = Kx(f_o - f_c)$ olacaktır.

Sauerbrey, kuvars kristal bir rezonatörün frekans boşluğunun eklenen kütle ile direkt orantılı olduğunu göstermiştir. Sauerbrey'in yapmış olduğu bu çalışma çok küçük kütlelerin bile ölçülmesinde yeni bir yöntem olarak kabul edilebilir. Kuvars kristal yüzeyindeki kütleli bir artış, rezonans frekansında bir düşüşe neden olmaktadır (Ayhan ve ark., 2011).

Sauerbrey denkleminin kuvars kristal sensörlerde uygulanabilmesi için; ölçümü yapılacak olan analitin kütlesi katı olmalı, kuvars kristal yüzeyinde homojen olarak dağılmalı ve frekans değişimi $\Delta f / f < 0,02$ olmalıdır.

2.4. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP)

Moleküler etkileşim kavramı ilk kez 1894 yılında Fischer'in enzim-substrat etkileşimi olarak ortaya çıkmaya başlamıştır. "Anahtar-kilit" modeli ile gösterilen bu etkileşimin ortaya çıkması ile birlikte konuyla ilgili modern fikirler de artmaya başlamıştır. Bu tanımda, enzim molekülleri ile substrat molekülleri arasında bir uyum söz konusu olup substrat bir anahtar gibi enzimin aktif bölgeleriyle etkileşmektedir. Moleküler etkileşim kavramının son zamanlarda ilgi gören uygulama alanlarından biri de moleküler baskılama yöntemidir. "Moleküler Baskılama", antibadi/antijen ya da enzim/substrat gibi biyolojik sistemlerin tanıma mekanizmasını polimerik yapılara aktaran tekniktir (Mosbach ve Ramström, 1996). Bu yöntemde seçiciliği yüksek olarak ayrılmak istenen farklı matrikslerden iyonlar, organik moleküller ve biyomolekülleri elde etmek amacıyla akıllı polimerler elde edilir. Ayrıca elde edilen bu polimerlerin farklı uygulamalarda kullanılmasını artıran yeni bir tekniktir.

Hedef molekülü tanıyabilecek tarzda yapısı olan polimerlerin oluşturulması işlemi moleküler baskılama açısından önem arz eder. Moleküler baskılanmış polimer eldesi için kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çözücü, çapraz bağlayıcı gibi maddelere ihtiyaç vardır. Sentezleme işlemi sonucu oluşan merkezler kalıp molekülün boyut ve şeklini tanıma özelliğine sahip olurlar.

Hedef molekül için benzersiz bir seçiciliğe sahip olan moleküler baskılanmış polimerler; mekanik bir etkiye, ısı ve sıcaklığa, asitlere, bazlara, suya ve organik çözücülere dayanıklıdırlar (Wulff ve ark., 1977).

Elde edilmiş yöntemleri basit ve ucuz olan bu polimerler uzun süre performanslarında herhangi bir bozunma olmaksızın muhafaza edilebilirler (Piletsky ve ark., 2001; Haupt ve Ye, 2004; Rao ve ark., 2004). Bu özellikler MIP'lerin ilaç sanayi, ekoloji ve yaşam gibi alanlarda kullanımını artırmaktadır (Yavuz ve ark., 2006; Spivak, 2005; Ramstrom ve ark., 1996; Anderson ve ark., 1990).

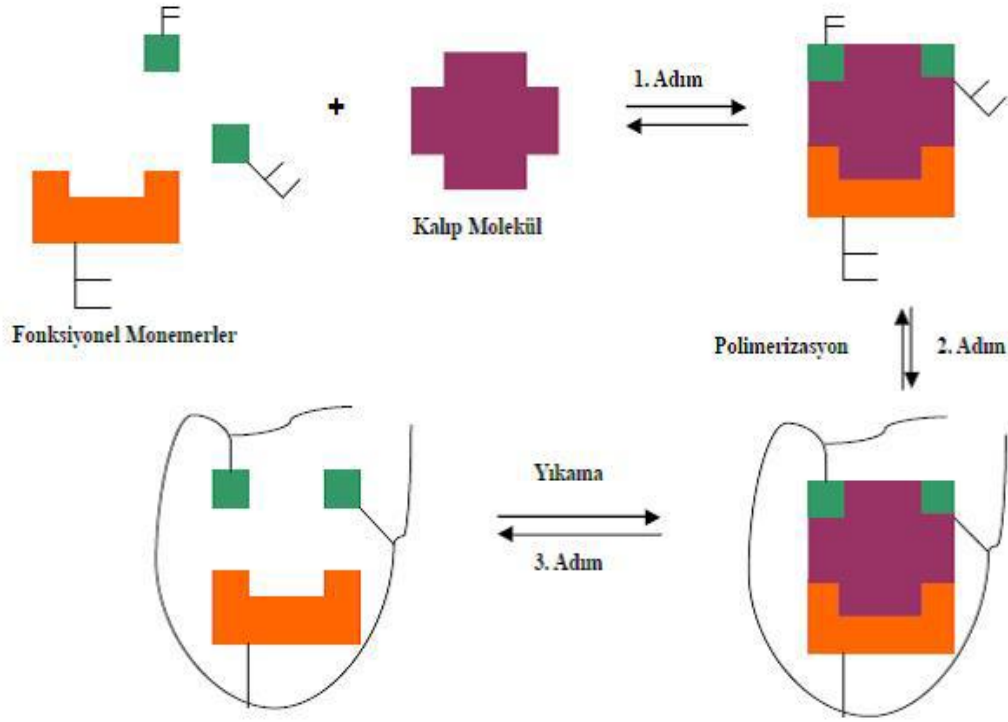
Moleküler baskılanmış polimerlerin; yüksek kararlılığı, düşük maliyeti ve polimerizasyon basamaklarının sensör teknolojisinde kullanılan mikro üretime tamamen uyumlu olması gibi avantajları pek çok pratik uygulamada sentetik tanıma elemanı olarak kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır (Piletsky ve ark., 2001). Bundan dolayı kimyasal/biyosensörlerin geliştirilmesinde giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Herbisitler, şekerler, nükleik asit ve amino asit türevleri, ilaçlar, toksinler ve çözücüler için moleküler baskılanmış polimer temelli sensörler geliştirilerek, rapor edilmiştir (Guan ve ark., 2008; Piletsky ve ark., 2001). Bu yönüyle moleküler baskılanmış polimer temelli sensörler, son yıllarda araştırmacıların ilgisini çeken bir araştırma konusu haline gelmiştir (Holthoff ve Bright, 2007; Stephenson ve Shimizu, 2007; Piletsky ve Turner, 2002).

2.4.1. Moleküler Baskılama Tekniği

Moleküler baskılama işlemi genellikle üç basamaktan oluşur:

- 1- Baskılanacak molekül (kalıp molekül) ile fonksiyonel monomerler kovalent yada kovalent olmayan etkileşimler ile bağlanarak bir kompleks oluştururlar. Bu etkileşimde hedef molekülün yapısı ve kimyasal özelliği önemli yer tutar.
- 2- Uygun bir çapraz bağlayıcı ile fonksiyonel monomer-kalıp kompleksi polimerleştirilir.
- 3- Uygun bir yıkama ajanı kullanılarak, kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması sağlanır.

Şekil 2.6'da moleküler baskılı polimer hazırlama aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Moleküler baskılı polimer hazırlama aşamaları (Gültekin, 2009)

2.4.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılanmış polimer hazırlamak için fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşime göre kovalent ve kovalent olmayan iki farklı yaklaşım kullanılır.

2.4.2.1. Kovalent Baskılama

İlk olarak kovalent baskılama Wulff ve Sarhan tarafından geliştirilmiştir (Cazes, 2006). Bu teknikte, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında önce kovalent bağlanma olur. Polimerizasyondan sonra kalıp oluşturmak için, meydana gelen kovalent bağlar kırılarak polimerden uzaklaştırılması sağlanır. Baskılanmış olan polimer ile kalıp molekül bir araya getirildiğinde, aynı kovalent bağ tekrar meydana gelir (Shea ve Dougherty, 1986; Molinelli, 2004).

Avantajları:

Baskılama işlemi öncesinde monomer-kalıp molekül kompleksi oldukça kararlıdır ve bu sayede bağlanma bölgelerinin homojen dağılımı sağlanır. Bu teknikte; yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve polar çözücüler gibi polimerizasyon koşulları oldukça geniştir. Ayrıca kompleks, kovalent bağlarla bir araya getirilmiş ve oldukça kararlıdır (Ikegami ve ark., 2004).

Dezavantajları:

Monomer-kalıp molekül kompleksi sentezinde polimerizasyondan sonra hedefin uzaklaştırılması oldukça zor olduğundan sık sık sorunlar çıkabilir. Ayrıca sentez yöntemi ekonomik değildir (Kriz ve ark., 1997 ve Sellergren, 1998). Hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısının sınırlı olması da bu tekniğin başka bir dezavantajıdır. Kovalent bağ oluşması sebebiyle hedefin bağlanma ve ayrılması yavaştır (Steinke ve ark., 1995).

2.4.4.2. Kovalent Olmayan Baskılama

Bu baskılamada kalıp molekül ile kovalent olmayan etkileşime girebilecek fonksiyonel monomerler kullanılır. Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün birbiri ile etkileşimi hidrojen bağı, van der Waals etkileşimleri gibi kovalent olmayan etkileşimlerle olur. Polimerizasyon bittiğinde, kalıp molekülün çözücü yardımıyla polimerden uzaklaştırılması sağlanır. Kovalent olmayan etkileşimlerle hedef molekül ile baskılanmış polimerler birbirleri ile etkileşirler (Ersöz ve ark., 2005).

Avantajları:

Monomer-kalıp kompleksinin sentezine gerek yoktur. Bu yöntemde polimerizasyondan sonra kalıp molekül polimerden kolayca uzaklaştırılır. Çünkü non-kovalent etkileşimler zayıf etkileşimlerdir. Ayrıca uygulama koşullarına göre farklı formlarda hazırlanabilir. Hedef moleküle olan afinitesini kaybetmeksizin yıllarca saklanabilir.

Dezavantajları:

Non-kovalent etkileşimleri arttırmak amacıyla polimerizasyon koşulları sınırlıdır. Fonksiyonel monomerler ve hedef molekülün etkileşimi özgül değildir. Bağlanma bölgelerinin yapısı heterojendir. Bu özellik nedeniyle spesifik olmayan bağlanmalara ve hedef molekülün zayıf molekülleri de tanınmasına yol açabilmektedir (Katz ve Davis, 1999; Dong ve ark., 2002).

2.4.3. Moleküler Baskılamanın Temel Bileşenleri

Moleküler baskılama yönteminin etkin olabilmesi için temel bileşenler önemlidir. Moleküler baskılamanın temel bileşenleri; kalıp molekül, fonksiyonel monomerler, çapraz bağlayıcı, çözücü ve başlatıcıdır.

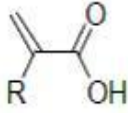
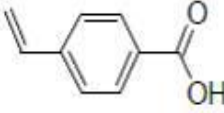
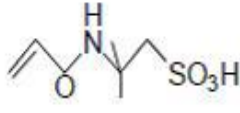
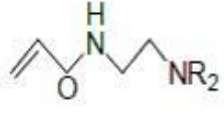
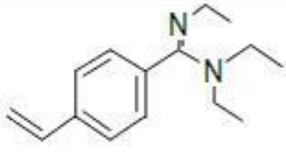
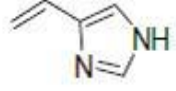
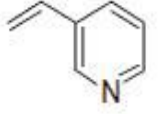
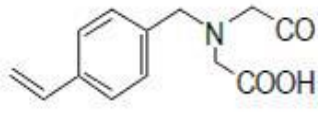
2.4.3.1. Kalıp (Hedef) Molekül

Tüm moleküler baskılama işlemlerinde baskılanacak kalıp molekül, baskılamanın etkin yapılabilmesi için önemlidir. Fonksiyonel monomerlerde bulunan fonksiyonel gruplar kalıp molekülle etkileşir. Kalıp molekül polimerize olacak gruplar içermelidir. Aynı zamanda reaksiyon koşullarına herhangi bir fiziksel yada kimyasal müdahale edilmesiyle, kalıp molekülün yada polimer kompleksinin yapısında bozunma olmaması gerekir. Ayrıca ultraviyole ile yapılan polimerizasyon işlemlerinde meydana getirilen ön organizasyonun kararlılığı da önemlidir. Baskılama işleminin başarısını, kalıp molekülün konformasyonundaki ufak değişiklikler bile etkilemektedir (Davies ve ark., 2004). Moleküler baskılamada kullanılan kalıp moleküller içerisinde ilaçlar, aminoasitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar bulunabilir (Cormack ve Mosbach, 1999).

2.4.3.2. Fonksiyonel Monomerler

Baskılama işleminde fonksiyonel monomerlerin seçimi de çok önemlidir. Çünkü hedef molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki geri-bağlanma adımı moleküler baskılanmada önemli bir noktadır. Fonksiyonel monomerler, baskılanmış tanıma merkezlerindeki bağlanma etkileşimlerinden sorumludurlar. Kompleks oluşumu ve baskılama etkinliğinin artırılması için fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün fonksiyonel gruplarının uyuşması çok önemlidir. Kalıp moleküle uygun boşluklar oluşturması bakımından monomerin seçimi önemlidir. Karboksilik asitler, sülfonik asitler ve bazı bazlar moleküler baskılamada kullanılan fonksiyonel monomerlerdir (Gönen, 2006). Kovalent baskılama tekniğinde, kalıp molekül ile vinil gruplar birbirlerine kovalent bağlanma ile bağlanırlar. Moleküler baskılama işleminde en yaygın fonksiyonel monomerler olarak akrilik asit amitleri, esterleri ve metakrilik asit kullanılmaktadır. Kovalent olmayan baskılama tekniğinde ise uygun fonksiyonel gruplar için vinil monomerleri kullanılır.

Çizelge 2.1. Moleküler baskılı polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler (Dmitrienko ve ark., 2004)

Fonksiyonel Monomer	Monomerin Yapısal Formülü
Akrilik asitler (R=H, CH ₃ , CF ₃ , CH ₂ COOH)	
Vinilbenzoik asitler	
Akrilamidosülfonik asitler	
Aminometakril amidler	
N,N'-Dietil-4-vinilbenzamin	
Vinylimidazoller	
Vinilpiridinler	
4-(Vinilbenzil)iminodiasetik asit	

2.4.3.3. Çözücü

Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanmasında önemli rolü olan diğer bir etken de çözücü seçimidir. Çözücü, baskılama işleminde kullanılan temel bileşenlerin tek bir fazda bir araya gelmesini sağlar. Ayrıca çözücü, gözenek oluşumunu ve sıcaklık dağılımını da etkiler. Seçicilik için anorganik çözücüler ile oluşturulan moleküler baskılanmış polimerler, polar organik çözücülere göre daha çok tercih edilir (Yu ve Mosbach, 1997). Oluşan polimerin analite seçiciliği için meydana gelen boşluğun analit için uygun olması da çözücüye bağlıdır (Sönmezler, 2011). Baskılama çeşidine göre çözücü seçimi değişir. Kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasında etkileşimi oluşturma ve baskılama verimini yükseltme açısından çözücü seçimi kovalent olmayan baskılamada daha önemlidir.

2.4.3.4. Çapraz Bağlayıcılar

Moleküler baskılanmış polimerleri hazırlarken, çapraz bağlayıcının seçimi de önemlidir. Çapraz bağlayıcının kullanım amacı; kalıp molekülün etrafında sabit bir yapı oluşturmak, bu yapının morfolojisini kontrol etmek, baskılanmış kalıp moleküle özgü bağlanma bölgelerinin kararlı olması sağlamak ve polimer matrikse mekanik kararlılık kazandırmaktır (Komiya ve ark.,2003). Çapraz bağlayıcıların ve çapraz bağlanma miktarı polimerik matriksin çözücüde çözünmesini engeller (Cormack ve Elorza, 2004). Etkin bir moleküler baskılamanın olabilmesi için, çapraz bağlayıcılar ile fonksiyonel monomerlerin uyum içinde olması çok önemlidir. Bu uyum meydana gelmediği zaman, fonksiyonel monomer veya çapraz bağlayıcıdan biri polimerizasyon esnasında baskın çıkabilir ve homojen kompleks polimer meydana gelmeyebilir. Çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomere oranı da önemlidir. Çapraz bağlayıcı/fonksiyonel monomer derişim oranları, moleküler baskılanmış polimerlerdeki farklı sayıda bağlanma bölgelerinin oluşumuna yol açar. Ayrıca bu oran molekül seçiciliğini etkiler (Dickert ve Hayden, 1999).

Çizelge 2.2'de yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar verilmiştir.

Çizelge 2.2. Moleküler baskılı polimer sentezinde yaygın olarak kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar

Çapraz Bağlayıcı	Moleküler Yapısı
Etilen glikol dimetakrilat (EDMA)	
Divinilbenzen	
Pentaeritrol tetraakrilat	
N,N'-metilendiakrilamid	
N,N'-1,4-fenilendiakrilamid	

2.4.3.5. Başlatıcılar

Serbest radikal polimerizasyonu, serbest radikal oluşturan başlatıcıların ısı bozunmasıyla başlatılabilir. Başlatıcılar reaksiyonda monomere göre çok az kullanılır. Hedef molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki non kovalent bağlanmaların çok zayıf olduğu şartlarda, çok yüksek sıcaklık değerlerine çıkılması uygun olmaz. Bundan dolayı reaksiyonlarda ultraviyole bozunma kullanılır. Başlatıcı olarak genellikle 2,2'-azobis(izobütironitril) (AIBN), 2,2'-azobis(2,4-dimetil valeronitril) (ADVN) ve benzoil peroksit (BPO) kullanılır.

2.5. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, bir maddenin diğeri bir madde yüzeyinde veya iki faz arasındaki ara yüzeyde derişiminin artması ya da bir başka ifadeyle moleküllerin, temas ettikleri yüzeydeki çekme kuvvetlerine bağılı olarak o yüzeyde birikmesidir. Bu fazlar; sıvı-katı, sıvı-sıvı, gaz-sıvı ve gaz-katı olabilir. Yüzeyde tutunan malzemeye “adsorblanan madde veya adsorbat” ve üzerinde adsorpsiyonun gerçekleştiğı katıya ise “adsorbent veya adsorban” adı verilmektedir. Adsorpsiyon işleminin tersi desorpsiyondur. Desorpsiyon, adsorplanan maddenin ortama geri verilmesi yani yüzeyde derişimin azalmasıdır.

2.5.1. Adsorpsiyon Oluşum Mekanizmaları

Çözücüde çözünen madde ile katı yüzeyi arasında meydana gelen temas sonucu adsorpsiyon olayı gerçekleşir. Yüzeyde bulunan atom, iyon ve molekül gibi kimyasal türler, dengelenmemiş kuvvetlerin etkisi altındadır. Molekölü dışarıya doğru çeken güç, içeriye doğru çeken güçten daha küçük olmalıdır. Bu sebepten dolayı molekülü alt yöne doğru çeken güç yüzeyi küçültme meyilindedir. Çözücüde çözünmüş veya gaz halindeki moleküller, katı yüzeyindeki atomların doyurulmamış kuvvetleri tarafından katı yüzeyine doğru çekilmektedir ve böylelikle dengede olmayan yüzey kuvvetleri gaz veya çözünmüş moleküllerce dengelenmektedir. Dolayısıyla katı maddenin yüzey gerilimi, gaz moleküllerinin adsorpsiyonu ile küçültülmektedir. Burada meydana gelen hadise sistemin yüzey enerjisini azaltmaktadır. Yüzey enerjisini küçültme kendiliğinden meydana gelen bir olaydır. Adsorpsiyon ile sistemin serbest enerjisinde bir azalma olmaktadır. Bu da adsorpsiyonun, kendiliğinden meydana gelen bir olay olduğunu göstermektedir (Özer, 2004).

2.5.2. Adsorpsiyon İzotermleri

Adsorpsiyon olayında adsorplanan madde miktarı, yüzeyde tutunan maddenin derişimine ve ortamın sıcaklığına bağılı olarak değişir. Genel olarak sıcaklık sabit tutulduğu müddetçe, adsorplanan madde miktarı, derişimin fonksiyonu olarak tespit edilir. Denge anında sabit sıcaklıkta çözeltide adsorplanmadan kalan çözünenin derişimine karşı birim adsorban kütlelerinde çözünenin adsorplanan miktarının grafiğı çizilerek adsorpsiyon izotermi adı verilen sonuç fonksiyonu elde edilir (Lin ve Liu, 2000).

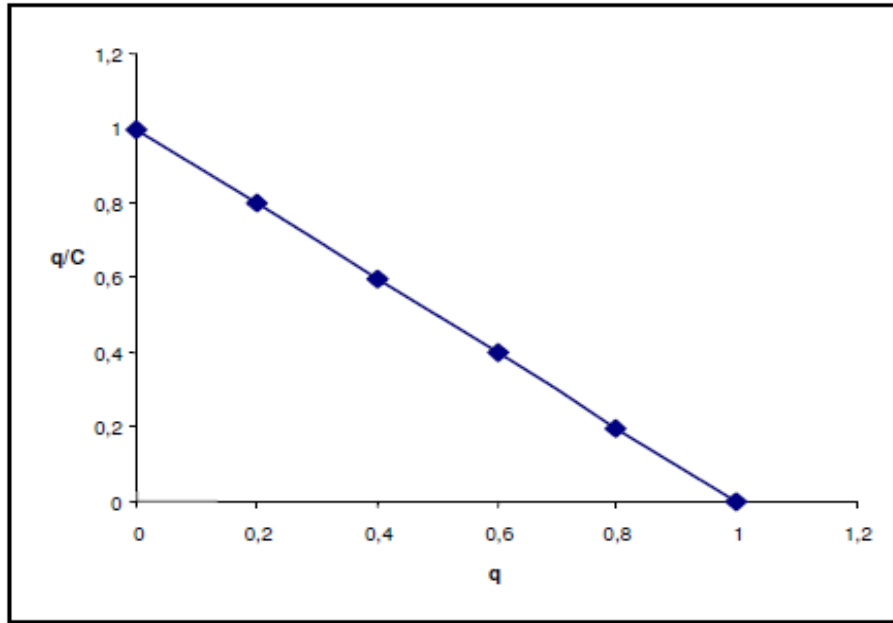
2.5.2.1. Scatchard Analizi

Scatchard analizi, adsorplanan maddenin belirgin özelliklerinin ve çeşitli parametrelerinin incelenmesi açısından daha güvenilir sonuçlar verebilen doğrusal bir grafikdir. Bu grafikte doğrusallıktan önemli ölçüde sapmalar gözlemlendiğinde, kimyasal adsorpsiyon yerine fiziksel adsorpsiyonun meydana geldiği düşünülebilir. Scatchard analiz sistemine göre çizilen grafikler, lineer bir grafik verirse bu da Langmuir modelinin uygulanabilirliğinin bir göstergesidir. Bu doğru da ligandın spesifik bağlanacağı yerlerin tür sayısını belirlemede yardımcı olmaktadır.

Adsorpsiyon olayının bir denge reaksiyonu olduğu düşünüldüğünde, Scatchard eğrisi için kullanılan denklemleri aşağıdaki şekilde elde edebiliriz:

$$q / C = (q_m / KD) - (q / KD) \quad (2.5)$$

Scatchard denklemi Langmuir'in kendi adıyla bilinen izoterminin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Buradaki q ; doyumluk kesrini, KD ; ayrışma sabitini, C ' de hareketli fazdaki ligand konsantrasyonunu vermektedir. Bu denklemi kullanarak q / C ' ye karşı q grafiği çizildiğinde, lineer bir grafik elde edilir. Elde edilen grafikteki eğim, $-1/KD$ 'yi, ve kayma değeri q_m/KD 'yi verecektir (Uçan, 2002).



Şekil 2.7. Scatchard grafiği

2.5.2.2. Langmuir Analizi

Langmuir izoterminde yüzeyde adsorplanan moleküllerin tek tabaka halinde adsorlandığı, adsorpsiyonda yüzeyin her tarafının örtülmediği yer yer örtülmelerin olduğu, yüzeyin her tarafında adsorpsiyon enerjisinin homojen olduğu ve yüzeyde tutunan moleküller arasında karşılıklı etkileşme olmadığı gibi varsayımlar geliştirilmiştir.

Bu varsayımlara dayanarak aşağıdaki bağıntı verilebilir.

$$\frac{1}{Q} = \left(\frac{1}{[Q_{max} \cdot b]} \cdot \frac{1}{C} \right) + \left(\frac{1}{[Q_{max}]} \right) \quad (2.6)$$

Burada;

b : Langmuir sabitini,

Q : Polimere bağlanan madde miktarını,

C : Serbest madde derişimini,

Q_{max} : Bağlanma bölgelerinin maksimum sayısını göstermektedir.

Burada, $\frac{1}{C}$ 'ye karşılık $\frac{1}{Q}$ grafiği elde edildiğinde doğrunun eğimi $\frac{1}{Q_{max} \cdot b}$ 'yi ve kesim noktası da $\frac{1}{Q_{max}}$ 'ı verecektir. Bu değerlere bakılarak Q_{max} ve langmuir sabiti (b) hesaplanır.

2.6. Kaynak Özetleri

2.6.1. Triptofan Tayini ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Farklı besin, gıda numunelerinde triptofan miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmalar şu şekilde özetlenebilir.

Szunerits ve ark. (2010), bor kaplı elmas nanotellerinin hazırlanması ve triptofanın hassas elektrokimyasal tespiti için uygulama yapmışlardır. Yapılan çalışmanın tayin limiti $5,0 \times 10^{-7}$ M olarak belirlenmiştir.

Goyal ve ark. (2011), altın nanopartiküller ile indiyum kalay oksit yüzey modifikasyonunun etkisi ile triptofanı elektrokimyasal olarak tayin etmişlerdir. Yapılan çalışmada triptofan tayin limiti $0,025 \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir.

Zhao ve ark. (2011), triptofan tayini için, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ultraviyole ve florimetrik algılama yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde, triptofan için elde edilen tayin limiti $0,02 \mu\text{M}$ 'dır.

Zhang ve ark. (2012), çalışmalarında; askorbik asit, dopamin, ürik asit ve triptofanın eş zamanlı saptanması için grafen melez tüp benzeri yapının Facile sentezini geliştirmişlerdir. Geliştirilen sistemde triptofan için tayin limiti $0,06 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur.

Mao ve arkadaşları (2012), triptofan tespiti için modifiye edilmiş camı karbon elektrot kullanılarak basit bir elektrokimyasal yöntem geliştirmişlerdir. Elektrot, tek kap içerisinde hidrotermal yöntem kullanılarak çekirdek-kabuk yapıları nanopartiküller ile sentezlenmiştir. Karakterizasyon işlemlerinde taramalı elektron mikroskobu, transmisyon elektron mikroskobu ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kullanılmıştır. Elektrot gerçek numunelerde triptofan konsantrasyonunun belirlenmesi için tatmin edici sonuçlar vermiştir. Çalışmanın tayin limiti $4,0 \times 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur.

Wang ve ark. (2013), bor katkı elmas ve elmas nanotel elektrotlar kullanarak triptofan ve tirozin aynı anda elektrokimyasal algılama metodu ile tanımlamışlardır. Tanımlanan metodun triptofan için tayin sınırı $5,0 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur.

D'Souza ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada, askorbik asit (AA), dopamin (DA) ve ürik asit (UA) mevcudiyetinde fizyolojik pH'da L-Triptofan seçici olarak saptanması için biyolojik uyumlu bir modifiye karbon pasta elektrot (CPE) geliştirmişlerdir. Hazırlanan prosedür ile triptofan için tayin limiti $6,8 \times 10^{-9}$ M olarak bulunmuştur.

Beitollahi ve arkadaşları (2014), epinefrin ve triptofanın eşzamanlı belirlenmesi için, bir nano-bazlı elektrokimyasal sensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada vinil ferrosen ve karbon nanotüpler (CNT) ile modifiye edilmiş bir karbon pasta elektrot, duyarlı ve seçici voltametrik tayin için kullanılmıştır. Triptofan ve epinefrinin kantitatif tayinlerinde sensör sonuç vermiştir.

Karimi-Maleh ve ark. (2014), nanokompozit-bazlı voltametrik eşzamanlı hassas bir elektrokimyasal sensör geliştirmişlerdir. Hazırlanan yöntem ile elde edilen tayin limiti 4.0 µM olarak bulunmuştur.

2.6.2. Kuvars Kristal Mikroterazi Yüzeyinde Moleküler Baskılanmış Polimer

Tekniğine Dayalı Çalışmalar

Kuvars kristal mikroterazi (QCM) yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer (MIP) tekniğine dayalı yapılan çalışmaların bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Lin ve arkadaşları (2004), yaptıkları çalışmada albumin protein karışımlarını analiz etmek için QCM ile mikrokütle tayini ve MIP'in seçici adsorpsiyonunu bir araya getirme çalışması yapmışlardır. Yapılan çalışmanın sonucunda albumin, MIP-QCM altın elektrodu üzerine başarılı bir şekilde modifiye edilmiştir. Bu çalışma diğer analizler ile karşılaştırıldığında, MIP-QCM sonuçlarının daha iyi olduğu kanısına varılmıştır.

Piacham ve arkadaşları (2005), yaptıkları çalışmada yüzey başlatılmış radikal polimerizasyon tekniği kullanarak ultra-ince MIP filmler hazırlamışlardır. Hazırlanan polimer filmler altın kaplı kuvars kristal rezonatörlerinin üzerine oluşturulmuştur. Bu çalışmada, farklı miktarlardaki MIP yüklü sensörlerin yeniden üretilebilirliği ve uzun dönem kararlılığa sahip olduğu ispatlanmıştır.

Bunte ve arkadaşları (2007), yaptıkları çalışmada patlayıcı madde olan 2,4,6-trinitrotoluenin tespiti için moleküler baskılanmış polimer tekniğine dayalı özel sensör kaplama malzemeleri geliştirmişlerdir. Bu amaçla, hazırlanan ince MIP filmler, QCM yüzeyine yüzey polimerizasyon tekniği ile sentezlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda patlayıcı maddelerin tespitinde QCM sensör, patlayıcı algılama limitinde TNT algılamak için kullanılabileceği gözlenmiştir.

Diltemiz ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada timin tayini için moleküler baskılanmış polimerler (MIP) ile kaplanmış kuvars kristal mikroterazi (QCM) sensörleri geliştirmişlerdir. Yapılan çalışma, timin baskılanmış sensörlerin timin tayini için geniş çalışma aralığına sahip olduğunu göstermektedir.

Gültekin (2009), bu çalışmada, dipikolinik asit (DPA) belleklere sahip Au ve Au-Ag nanosensörlerin, moleküler baskılama (MIP) temelli sentezlenmesi ve *bacillus anthracis* sporlarının dedekte edilmesinde kullanılmasını gerçekleştirmiştir. Ayrıca, 8-OHdG belleklere sahip QCM elektrotun moleküler baskılanmış polimer temelli sentezlenmesi ve hasarlı DNA tayininde kullanılması da araştırılmıştır.

Apodaca ve arkadaşları (2010), yaptıkları çalışmada folik asite dayalı QCM sensörü elde etmek için politertiyofene özgü elektro-polimerleştirilmiş moleküler baskılanmış polimer (E-MIP) hazırlamışlardır. Çalışmanın sonucunda, E-QCM aracılığıyla izlenen folik asidin algılanması için bis-tertiyofen dendron-temelli E-MIP sensör filmlerinin başarıyla yapıldığı gözlenmiştir. Folik asit için, 0 ile 100 µM arasındaki konsantrasyon aralığında, E-MIP/QCM film sensörüyle oldukça iyi bir lineerlik ($R^2=0,985$) elde edilmiştir.

2010 yılında Zhou ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada QCM kristali üzerinde MIP üretimi için, kalıp molekül eşliğinde dopaminin polimerizasyonuna dayalı, QCM kristaline modifiye edilmiş moleküler baskılanmış polidopamin üretebilecek kolay, ucuz ve hızlı bir teknik geliştirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda üretilen m-MIP filmi, domoik asit için iyi bir seçicilik ve afinite göstermiştir. Yapılan çalışmada ayrıca m-MIP-QCM sensörün gerçek numunelerde, domoik asit tayini için kullanılabilmesi gösterilmiştir. Önerilen tekniğin tayin limiti 0,005 mg/L (5 ppb) olarak bulunmuştur. Bulunan bu sonuç Avrupa Birliği ve Amerika'nın yanı sıra Kanada yazarları tarafından belirlenmiş maksimum artık limitinin altındadır.

Sönmezler 2011 yılında yaptığı çalışmada histidin tayinine yönelik kuvars kristal mikroterazi (QCM) biyosensör hazırlamıştır. QCM biyosensör, QCM çipinin altın yüzeyine histidin baskılanmış poli(etilen glikol dimetakrilat – N-metakriloil-(L)-histidin metil ester/bakır(II)) (poli(EDMA-MAH/Cu(II)) partiküllerinin tutturulmasıyla hazırlanmıştır. Yapılan çalışmanın sonuçları, baskılanmış sensörün L-histidin için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

Karanfil (2013), yapmış olduğu çalışmada, kafeik asit tespitine yönelik moleküler baskılanmış polimer temelli kuvars kristal mikroterazi nanosensör geliştirmiştir. Kuvars kristal mikroterazi nanosensör, kafeik asidi tanıyan belleklerin kuvars kristal mikroterazi elektrot yüzeyinde oluşturulmasıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan nanosensör farklı gıda numunelerinde istenilen sonuçları vermiştir. Aynı zamanda baskılanmış nanosensörün, kafeik asit için yüksek seçiciliğe sahip olduğu bulunmuştur.

Hussain ve arkadaşları (2013), yapmış oldukları çalışmada asidik ve bazik olan iki farklı polimere dayalı folik asit MIP-ince filmleri ve MIP-nanopartikülleri üzerinde çalışma yapmışlar ve sensör ölçümleri için QCM kullanmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, QCM sensör sisteminin düşük ppm aralığındaki tayin limiti ile sulu sistemlerde folik asidi tayin etmek için kullanılabilceği görülmüştür.

Yukarıda yapılan çalışmalar incelendiğinde triptofan analizine dair çeşitli teknik ve yöntemler geliştirilmiş, farklı kimyasal maddeler için moleküler baskılanmış polimer temelli çalışmaların yapıldığı görülmüştür. Ayrıca farklı birçok bileşik tayini için kuvars kristal mikroterazi üzerinde moleküler baskılanmış polimer temelli çalışmalar yapıldığı da gözlenmektedir. Yapılan literatür araştırmasında triptofan analizine dair kuvars kristal mikroterazi elektrotta moleküler baskılanmış polimer temelli tek bir çalışmaya rastlanmış olup, bu çalışmada kuvars kristal mikroterazi elektrotun yüzeyine moleküler baskılanmış polimerlere dayanarak triptofanı tutturmuşlardır (Liu ve ark., 2006). Bu sensörün tayin limiti mikromolar seviyelerindedir ve herhangi bir gıda numunesindeki triptofan miktarı tespit edilmemiştir. Bu sebeple bu tez çalışmasında, triptofan için kuvars kristal mikroterazi elektrotta moleküler baskılama temelli nanosensör sentezlenmiş ve farklı gıda numunelerindeki miktar tayinine dair çalışmalar yapılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Yapılan deneysel çalışmaları şu başlıklar altında toplamak mümkündür:

1. 2-metakriloamidohistidin (MAH) ve 2-metakriloamidohistidin-Cu(II) [MAH-Cu(II)] monomerlerinin sentez ve karakterizasyon işlemleri
2. 2-metakriloamidohistidin-Cu(II) [MAH-Cu(II)]-Triptofan ön organize monomer sistemi ile QCM sensörünün hazırlanarak triptofan tanıyan belleklerin QCM elektrot yüzeyinde oluşturulması
3. MAH-Cu(II) monomerleri kullanılarak hazırlanan QCM nanosensörlerinin triptofan tayininde kullanılması, seçicilik ile ilgili çalışmalar ve farklı gıda örneklerindeki miktar tayini

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Triptofan, asetik asit, etanol Merck (Darmstadt, Germany) firmasından alınmış, Azobisisobutironitril (AIBN), L- fenil alanin Aldrich (Milwaukee, WI, USA) firmasından, etilenglikoldimetakrilat (EDMA) Fluka AG (Buchs, Switzerland) firmasından temin edilmiştir. Etilenglikoldimetakrilat hidrokinonin inhibitörü ile vakumda damıtılmış ve 4°C'da saklandıktan sonra kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Yaptığımız işlemlerde mikrogravimetrik ölçümler için 5 MHz, teflon tutturucuda AT kesimli kuartz kristaller ve kuvars kristal analizör (SRS Stanford Research Systems, Model QCM200 Quartz Crystal Microbalance Digital Controller) kullanılmıştır. AFM görüntüleri hpAFM, (Nanomagnetics Instruments, Oxford, UK) ile alınmıştır. Infrared spektrumları FTIR (Spectrum 100, Perkin Elmer, USA) ile alınmıştır.

3.3. Metakrilamidohistidin (MAH) Monomerinin Sentezi

2-metakriloamidohistidin monomerinin sentezlenmesinde kullanılan yöntemde; 5,0 g L-histidin ve 0,2 g NaNO₂, 30 mL K₂CO₃'da (% 5, v/v) çözülmüştür. Oluşan çözelti 0 °C'a soğutulmuştur. Sonra 4,0 mL metakroilklorür, bu çözeltiliye yavaş yavaş eklenmiştir. Oluşan çözelti, oda şartlarında 120 dakika boyunca azot atmosferi altında, manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Tepkime sonucunda, çözeltinin pH'ı 7,0'ye ayarlanmış ve etilasetat ile ekstrakte edilmiştir.

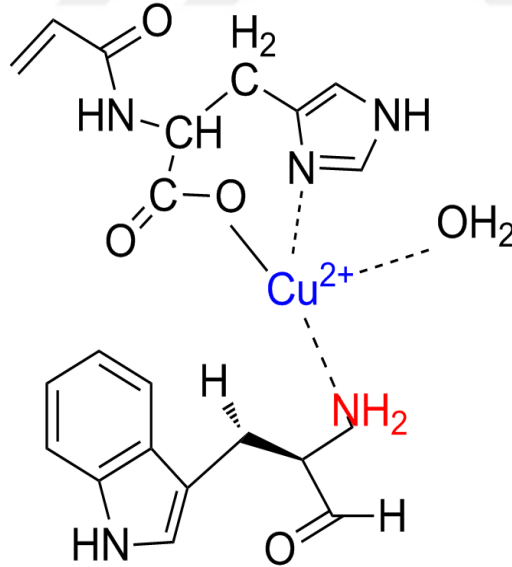
Sulu faz, döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAH), etanol/etilasetat karışımından kristallendirilerek saflaştırılmıştır (Say ve ark., 2002).

3.4. Metakrilamidohistidin-Cu(II) [MAH-Cu (II)] Metal-şelat Monomerinin Sentezi

Metakrilamidohistidin-Cu(II) [MAH-Cu (II)] metal-şelat monomerinin sentezi için 1 mmol MAH monomeri 15 mL etanolde çözülmüştür. Üzerine 1 mmol $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yavaşca ve sürekli karıştırılarak eklenmiştir. Bu çözelti 3 saat karıştırılmış ve oluşan berrak mavi renkteki kompleks, döner buharlaştırıcıda çözücüsü uzaklaştırılarak etanol/asetonitril karışımından kristallendirilmiştir (Bereli ve ark., 2008).

3.5. Metakrilamidohistidin-Cu(II)-triptofan [MAH-Cu(II)-triptofan] Metal-şelat Monomerlerinin Ön Organizasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

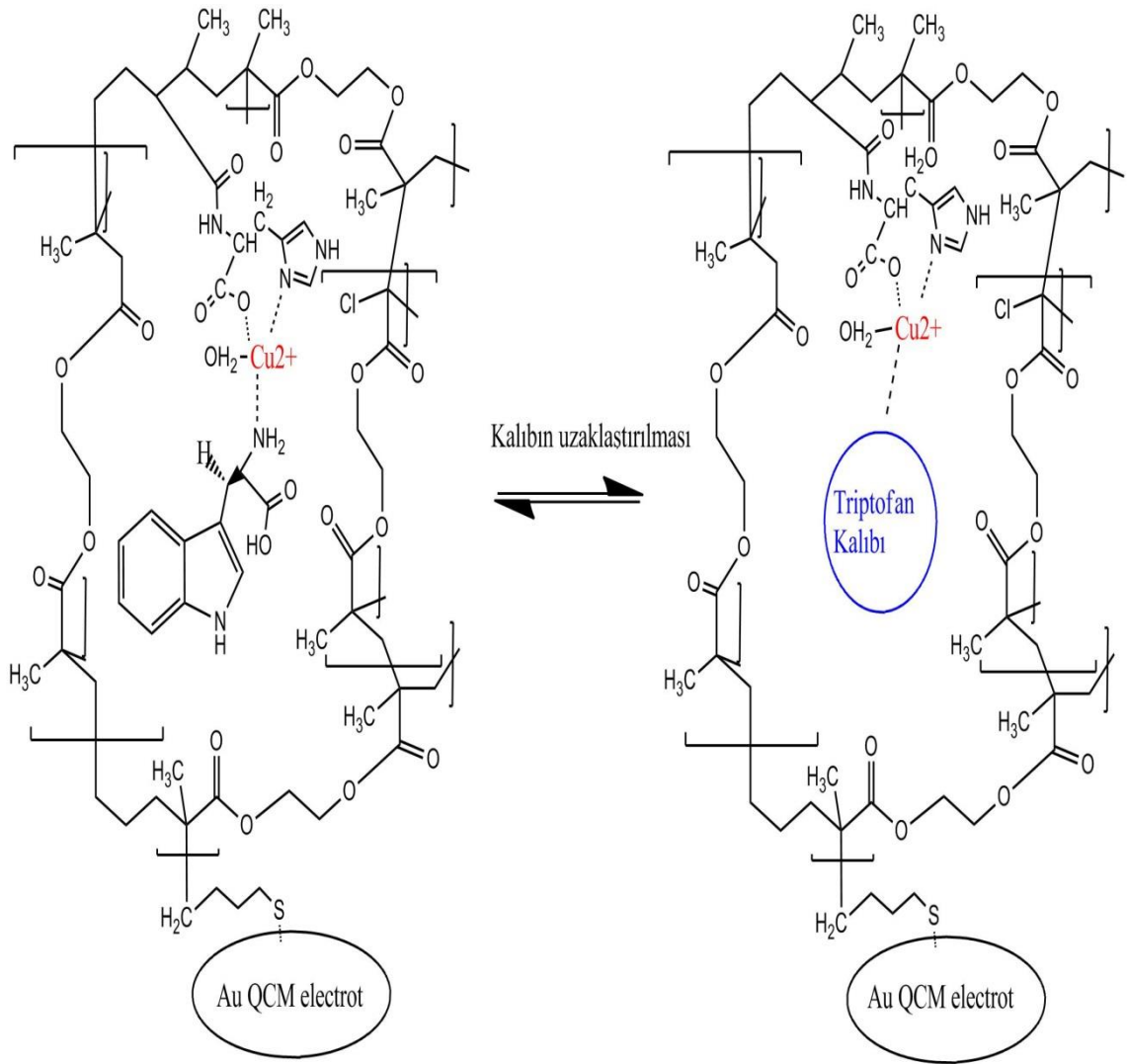
MAH-Cu(II)-triptofan metal şelat monomeri sentezi için; 0,01 mmol MAH-Cu(II) ve 0,01 mmol triptofan içeren etanol çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler birbiri üzerine eklenerek 24 saat boyunca karıştırılmıştır.



Şekil 3.1. MAH-Cu(II)-Tryptofan yapısı

3.6. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrotun Hazırlanması

Altın elektrotlar polimerize edilmeden önce piranha çözeltisi ($H_2SO_4:H_2O_2$, 3:1) yardımıyla yıkanmışlardır. Hazırlanan bu çözeltide kristaller 10 dakika bekletilmiş, önce etanol ile sonra saf su ile yıkanmış sonra kurutulmuştur. Kuvars kristal mikroterazinin yıkanmış altın yüzeyinde, polimerizasyona açık uç elde edebilmek için kristal, 1 gün süreyle 2 propen-1-tiol (allil merkaptan, $SH-CH_2-CH=CH_2$) içeren etanol/su (4:1, v/v) çözeltisinde bekletilmiştir. Kristalde oluşan tiyol gruplarının fazlasını çıkarmak için etanol ve saf su kullanılmıştır. MAH-Cu(II)-Triptofan monomeri (50 μ L), çapraz bağlayıcı (etilenglikoldimetakrilat) (250 μ L) ve AIBN karışımı etanolde çözülmüş ve çözelti kuvars kristal mikroterazi elektrotuna damlatılmıştır. Elektrot yüzeyi 4 saat süre ile oda sıcaklığında ultraviyole ışığı ile polimerize edilmiştir. Elektrotlar, etanol/asetik asit (9:1, v/v) geri yıkama çözeltisinde 1 gün süre ile bekletilerek, kalıp uzaklaştırılması sağlanmıştır (Liu ve ark., 2006).



Şekil 3.2. QCM nanosensör yüzeyindeki triptofan bellek oluşumu

3.7. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrot ile Sensör Ölçümleri

Geri yıkama çözeltisinde bekletilen triptofan baskılanmış kristaller saf su ile yıkayıp kurutulmasının ardından sabit rezonans frekansı (F_0) ölçülmüştür. Ardından fosfat tamponu içerisinde oluşturulan triptofan standart çözeltisi (16 μ L), kuvars kristal mikroterazi elektrodun yüzeyine damlatılmış ve 1 gün bekletilmiştir. Sensör frekansı kararlı oluncaya dek (F_1) takip edilmiştir. Triptofan farklı konsantrasyon için frekans kayma değeri, $\Delta F = F_0 - F_1$ eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan her ölçümlerden sonra triptofan, geri yıkama çözeltisi ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Sensörün frekans değeri yaklaşık olarak F_0 'a kadar geri elde edilmiştir.



Şekil 3.3. Kuvars kristal mikroterazi

3.8. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrot ile Seçicilik Çalışmaları

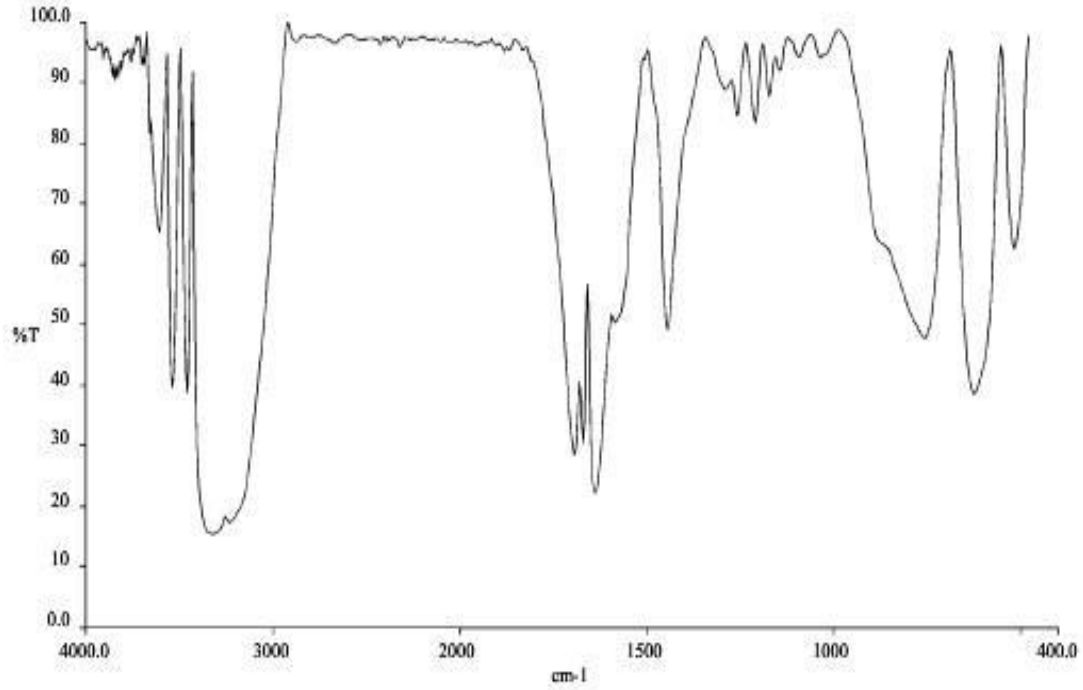
Triptofan baskılanmış QCM elektrot ile seçicilik çalışmalarında, L-fenil alanin tercih edilmiştir. Triptofan baskılanmış kristaller ilk önce saf su ile temizlenmiş ve kurutulduktan sonra F_0 ölçülmüştür. Ardından etanolde hazırlanan L-fenil alanin standart çözeltisi (16 μ L), QCM elektrotun yüzeyine damlatılmış ve 1 gün bekletilmiştir. Sensörün frekansı kararlı oluncaya dek (F_1) takip edilmiştir. L-fenil alanin için frekans kayma değeri, $\Delta F = F_0 - F_1$ eşitliği kullanılarak hesaplandıktan sonra L-fenil alanin geri yıkama çözeltisi ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Sensörün frekansı yaklaşık olarak F_0 'a kadar geri elde edilmiştir.

3.9. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrot ile Gerçek Numunelerde Triptofan Miktar Tayini

Triptofan baskılanmış QCM elektrot ile gerçek numune analiz çalışmaları için süt, muz, fıstık ve susam numuneleri kullanılmıştır. Triptofanın muz, fıstık ve susam numunelerinden izole edilmesinde, asit çözeltisinden faydalanılmıştır (Friedman ve Finley, 1971). Süt için süzme yöntemi kullanılmıştır. Triptofan baskılı kristaller önce saf su ile yıkanmış ve kurutulma işleminden sonra sabit rezonans frekansı (F_0) hesaplanmıştır. Daha sonra santrifüjde çöktürülen numunelerden elde edilen muz, fıstık ve susam çözeltileri ile süt numunesi sırasıyla (16 μ L), QCM elektrotun yüzeyine damlatılmış ve 1 gün bekletilmiştir. Sensörün frekansı kararlı hale gelene kadar (F_1) takip edilmiştir. $\Delta F = F_0 - F_1$ eşitliğinden frekans kaymaları hesaplanmıştır. Her bir ölçümden sonra elektrot geri yıkama çözeltisi ile yıkanarak triptofan uzaklaştırılmıştır. Sensörün frekansı yaklaşık olarak F_0 değerine kadar geri elde edilmiştir. Kalibrasyon çalışmalarından yararlanılarak süt ve gıda numuneleri içerisindeki triptofan miktarı tespit edilmiştir.

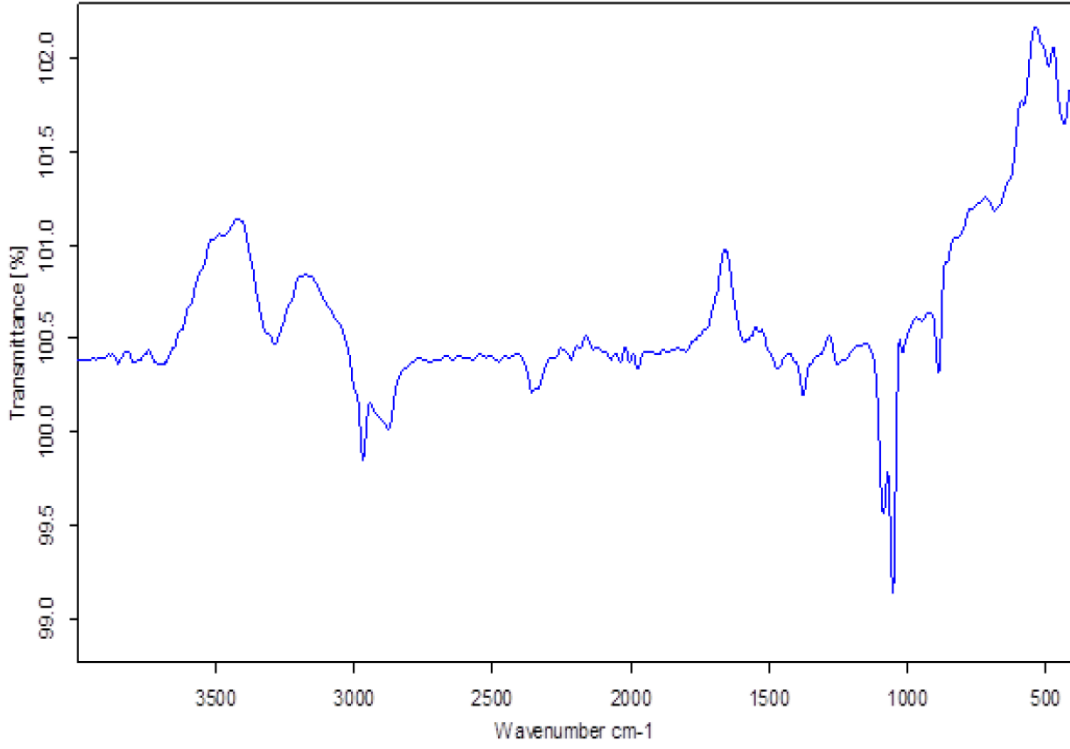
4. BULGULAR

4.1. MAH, MAH-Cu(II) Monomerlerinin ve MAH-Cu(II)-triptofan Kompleksinin Karakterizasyonu



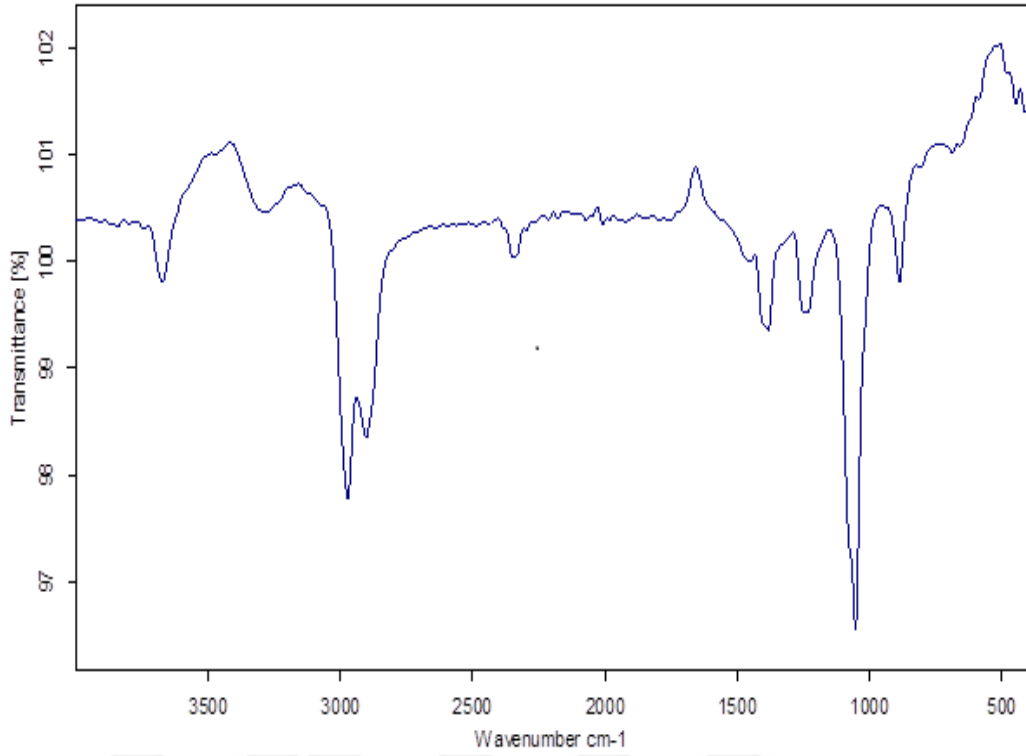
Şekil 4.1. MAH monomerinin FTIR spektrumu

MAH monomerinin karakterizasyon işlemi FTIR ile yapılmıştır. Şekil 4.1’de FTIR analizlerinin karakteristik pikleri incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bantları 1600 ve 1700 cm^{-1} ’de ve amid II gerilme titreşim bandı $1500-1550\text{ cm}^{-1}$ ’de görülmektedir.



Şekil 4.2. MAH-Cu metal şelat monomerinin FTIR spektrumu

MAH-Cu(II) metal-şelat monomerinin karakterizasyonu için kullanılan FTIR analizlerinin karakteristik pikleri ise şöyledir: FTIR: ν (cm^{-1}) = 3400 ile 3250 (-CONH-), 3095 (vinil C-H gerilme), 1680 (C=O karbonil gerilme), 1250 (C-O gerilme), 498 (Cu-N gerilme, zayıf bant). Burada, MAH monomerinin 1710 cm^{-1} 'de görülen karbonil bandının 1680 cm^{-1} 'e kaydığı görülmektedir. Ayrıca 498 cm^{-1} 'de görülen Cu-N etkileşim bandı da bakır iyonlarının MAH monomeri ile etkileşime girdiğini kanıtlamaktadır.

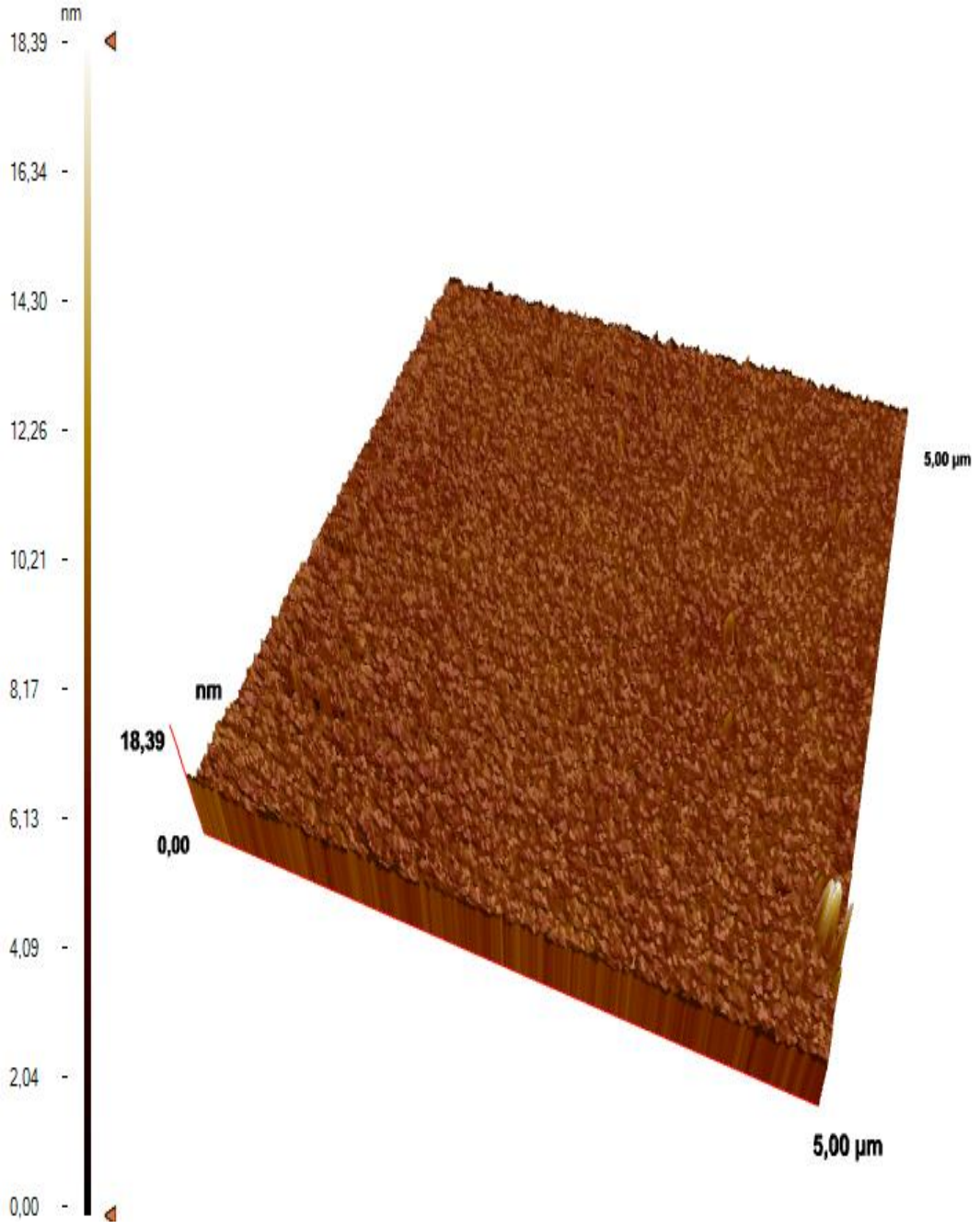


Şekil 4.3. MAH-Cu(II)-triptofan kompleksinin FTIR spektrumu

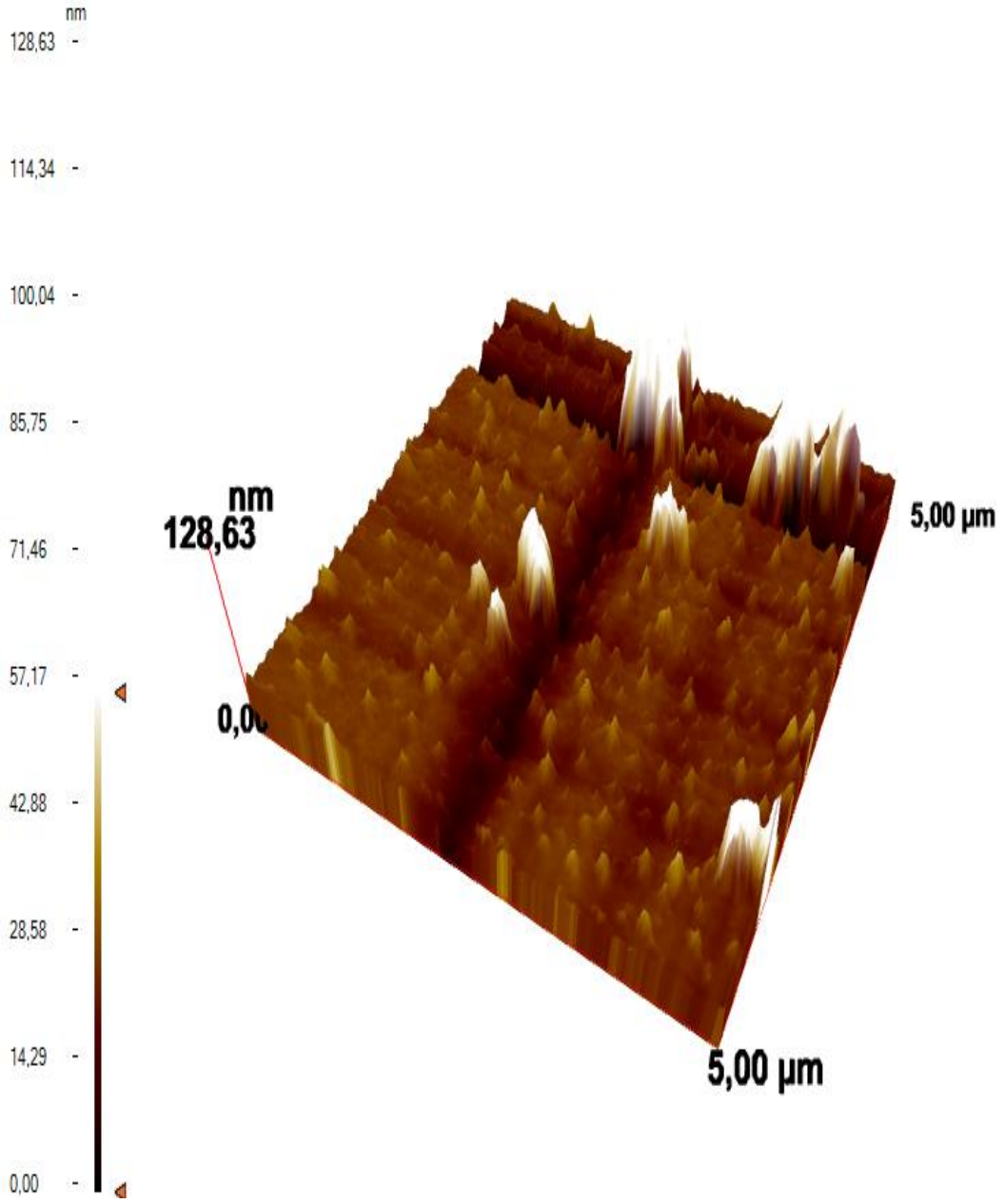
MAH-Cu(II)-triptofan kompleksinin FTIR karakterizasyonu incelendiğinde, 1150-1400 cm^{-1} 'deki çıkan pikler triptofandan gelen C-N etkileşiminin gerçekleştiğini göstermektedir.

4.2. Triptofan Baskılı QCM Elektrotun Yüzey Karakterizasyonu

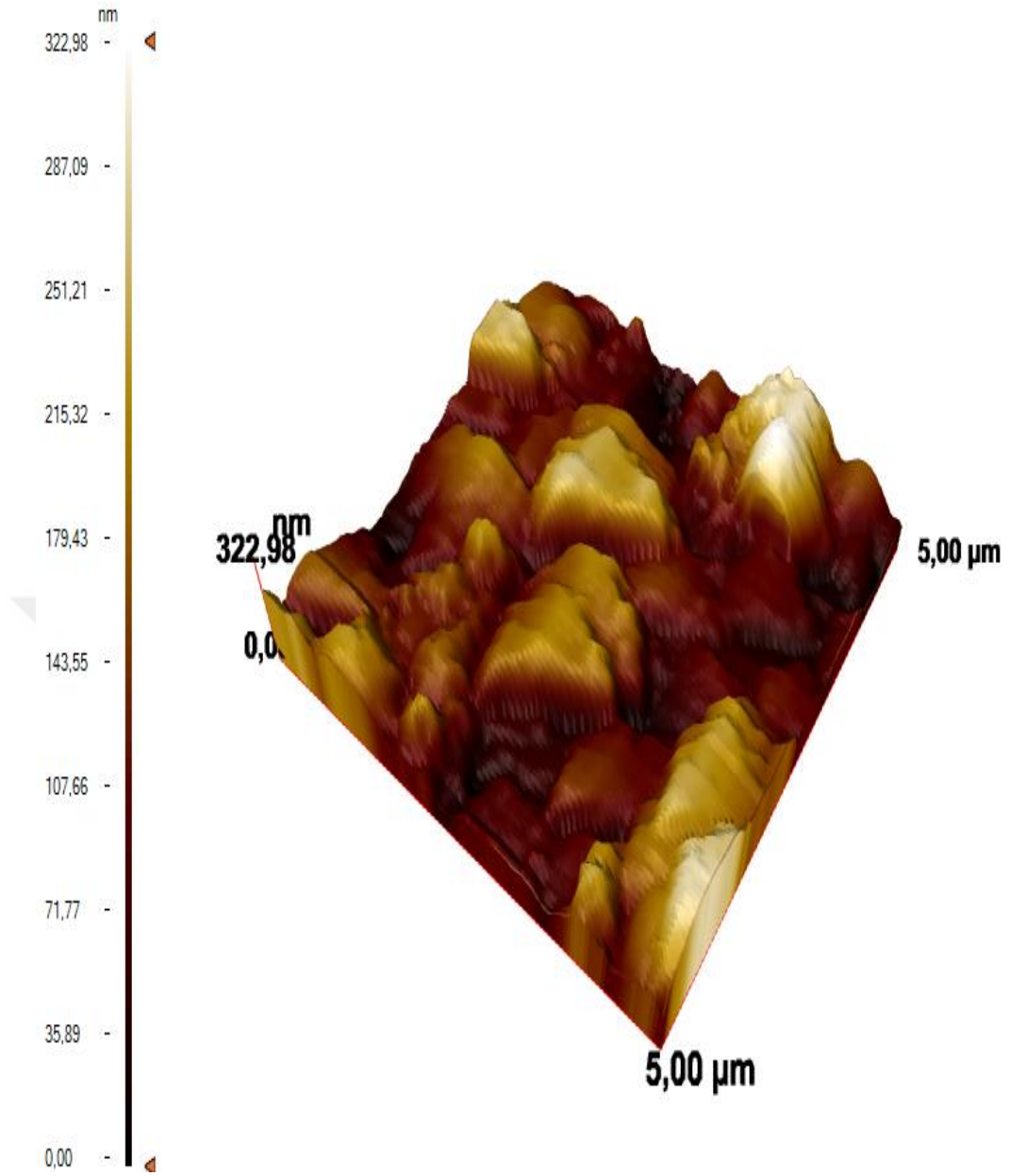
QCM elektrotun altın yüzeyinin allil merkaptan ile modifiye edilmesi sonucu, Au-S halinin ve polimerleşmeden sonra oluşan Au-S-polimer halinin, yüzey morfolojisindeki değişim görüntüleri atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile alınmıştır. Altın elektrotun saf halinin AFM görüntüsü Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Altın elektrotun, allil merkaptanla modifiyesinin görüntüsü Şekil 4.5'te verilmiştir. Polimerleşmeden sonraki yüzeyin yapısı ise Şekil 4.6'da görülmektedir. Yüzey morfolojisinde meydana gelen değişimlerden, yüzeyde modifikasyon ve polimerizasyon işleminin gerçekleştiği gözlenmektedir. Altın elektrot yüzeyinde meydana gelen modifikasyon ve polimerizasyon sonucunda sensörün kalınlığının 322,98 nm boyutunda olması sensörün nanosensör olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4. QCM elektrotun altın yüzeyinin AFM görüntüsü



Şekil 4.5. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş QCM elektrotun altın yüzeyinin AFM görüntüsü



Şekil 4.6. Polimerleştikten sonra QCM elektrotun altın yüzeyinin AFM görüntüsü

4.3. Ligand Etkileşimi Aracılığıyla Triptofan Baskılı QCM Nanosensörlerin Bağlama Etkileşimlerinin Ölçümü

Altın kuartz kristaller üzerine triptofan ligand-değişim metoduyla baskılı polimerlerini hazırlamak için, metakroil bazlı yeni bir yöntem geliştirilmiş ve triptofan MAH-Cu(II)-triptofan polimerinin triptofan seçiciliği incelenmiştir. Kalıp molekülün metakroil temelli metal-şelat kopolimerine bağlanması kristalin frekansına yansıyan kütlede bir değişime (Δm) neden olmaktadır. Kütle değişimi ve frekans kayması arasındaki bağıntı şu şekildedir:

$$\Delta F = - \frac{2F_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\rho\mu}} \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte;

F_0 : Temel frekans

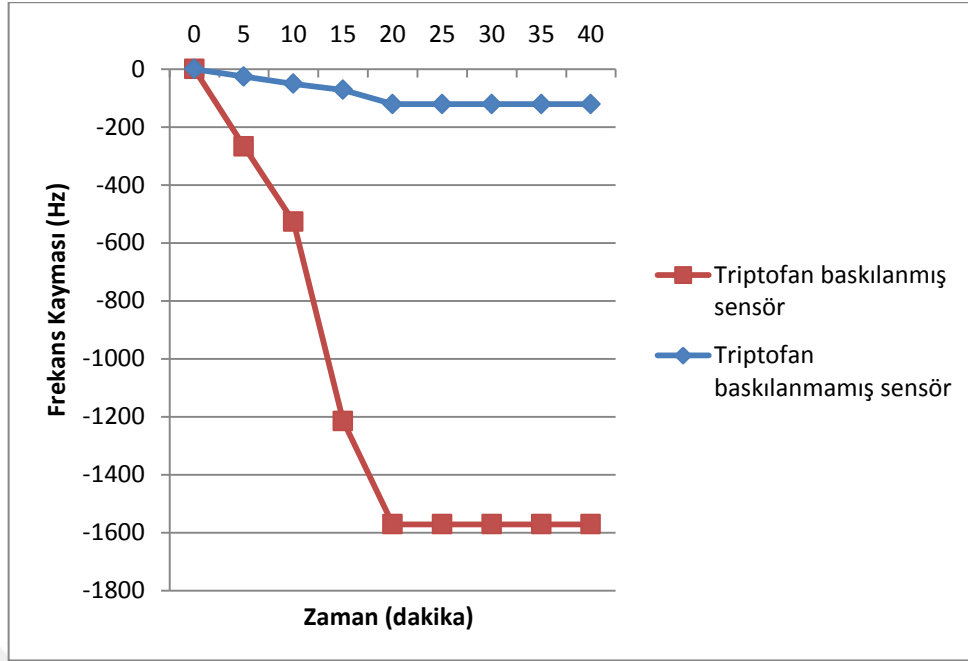
A : Piezoelektriksel yüzey alanı

ρ : Kuartzın yoğunluğu

μ : Kuartzın kayma modülünü göstermektedir.

Saf suda bulunan baskılı polimer kaplı sensörün frekansı kararlı olduğu an triptofan çözeltisi dedektör hücresinin üzerine damlatılmıştır. Triptofan çözeltisinin ilavesi ile birlikte sensörün frekansı azalmaya başlamış ve 20 dakika içinde sabit bir değere gelmiştir (Şekil 4.7).

Ligand değişim tepkimesinin hayli hızlı bir şekilde dengeye ulaştığı gözlenmiştir. Kuartz kristal üzerinde baskılanmış olan polimere triptofanın tutunması frekans değişikliğinden anlaşılmaktadır. Ayrıca baskılanmamış polimere triptofan bağlanmasının çok daha zayıf olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7. Tryptofan baskılanmış ve baskılanmamış nanosensör frekans değerleri

Baskılanmış polimer ve triptofan arasındaki bağlanma etkileşimleri ve eşitlik denklemini Scatchard analizi yöntemi ile hesaplanmıştır. Ayrıca bu analiz tekniği moleküler baskılanmış polimer çalışmalarında önceleri de faydalanılmıştır. Scatchard analiz işleminde aşağıdaki denklem kullanılmaktadır.

$$\frac{Q}{C} = \frac{Q_{max}}{K_D} - \frac{Q}{K_D} \quad (4.2)$$

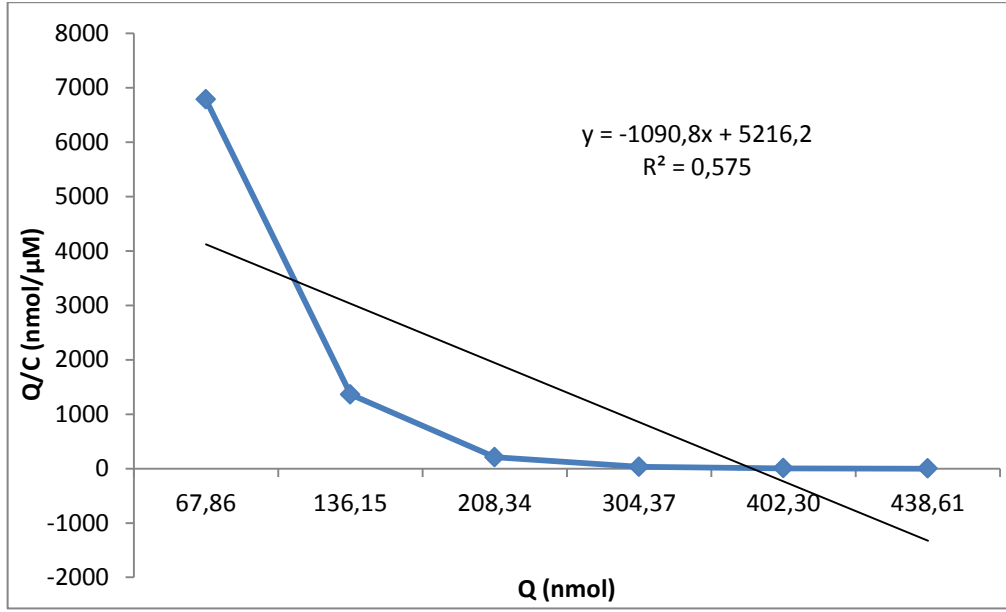
Bu denklemde;

Q : Polimere bağlanan triptofan miktarını

C : Serbest triptofan derişimini

Q_{max} : Bağlanma bölgelerinin maksimum sayısını

K_D : Ligand-değişim temelli metal-şelat kopolimerinin ayrışma sabitini ifade etmektedir.



Şekil 4.8. Triptofan baskılı polimerin Scatchard eğrisi

Şekil 4.8’de 0.01-1000 μM değerlerindeki triptofan çözeltisinin Scatchard eğrisi görülmektedir.

$$\frac{Q}{C} = -1090,8 Q + 5216,2 \quad (4.3)$$

Scatchard bağlanma sabiti (K_a) $109,08 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, Q_{max} 4.78 nmol eşitlik 4.3’ten hesaplanmıştır. Şekil 4.8 incelendiğinde grafik lineer değildir ve R^2 çok küçük çıkmıştır. Bundan dolayı bağlanma sabiti (K_a) ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı (Q_{max}) net olarak hesaplanamamıştır. Dolayısıyla triptofan baskılı MIP sensörünün Scathard analizi için uygun olduğu söylenemez.

Scathard analiz yönteminin uygun olmadığı durumlarda Langmuir analiz yöntemi kullanılmaktadır. Bu analiz yönteminde aşağıdaki denklem kullanılmaktadır.

$$\frac{1}{Q} = \left(\frac{1}{[Q_{\text{max}} \cdot b]} \cdot \frac{1}{C} \right) + \left(\frac{1}{[Q_{\text{max}}]} \right) \quad (4.4)$$

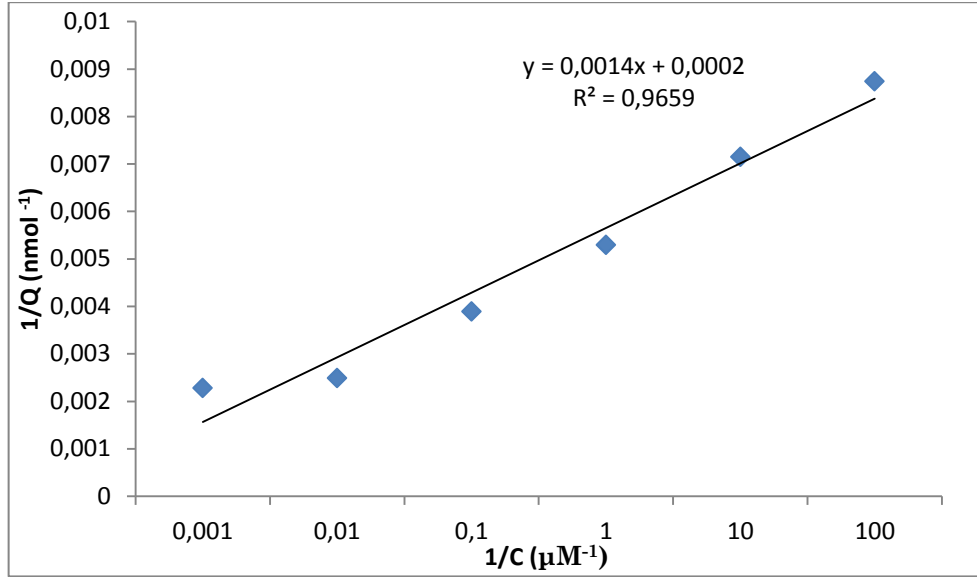
Bu eşitlikte;

b : Langmuir sabitini,

Q : Polimere bağlanan triptofan madde miktarını,

C : Serbest triptofan derişimini,

Q_{max} : Bağlanma bölgelerinin maksimum sayısını göstermektedir.



Şekil 4. 9. Triptofan baskılı polimerin Langmuir eğrisi

Şekil 4.9’da 0,01-1000 μM değerlerindeki triptofan çözeltisinin Langmuir grafiği görülmektedir.

$$\frac{1}{Q} = \left(\frac{0,0014}{c} \right) + 0,0002 \quad (4.5)$$

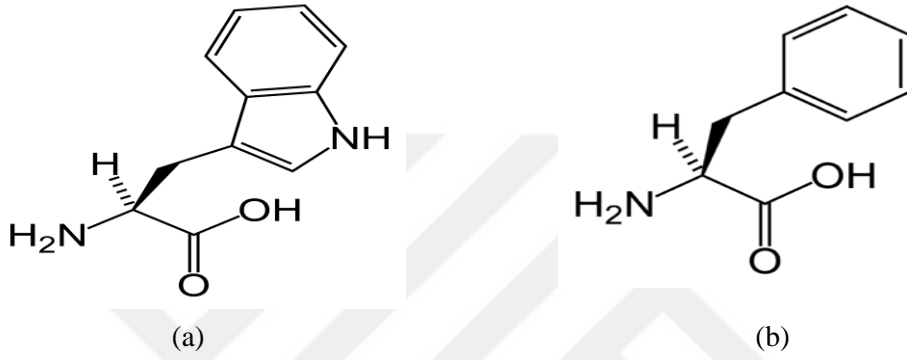
Eşitlik 4.4’ten MIP sensöre, triptofan bağlanması için Langmuir bağlanma sabiti (b) 142857 M⁻¹ ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, Q_{max} 5000 nmol olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.9’da R² değeri (0,9659) oldukça yüksektir. Bu değer yüksek olması triptofan baskılı QCM nanosensörünün Langmuir analizi için kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan Langmuir bağlanma sabiti değerinin de yüksek olması bağlanma bölgelerindeki afinitenin hayli kuvvetli olduğunu gösterir.

Çizelge 4.1. Triptofan baskılı QCM nanosensörün Langmuir ve Scatchard analizlerinin karşılaştırılması

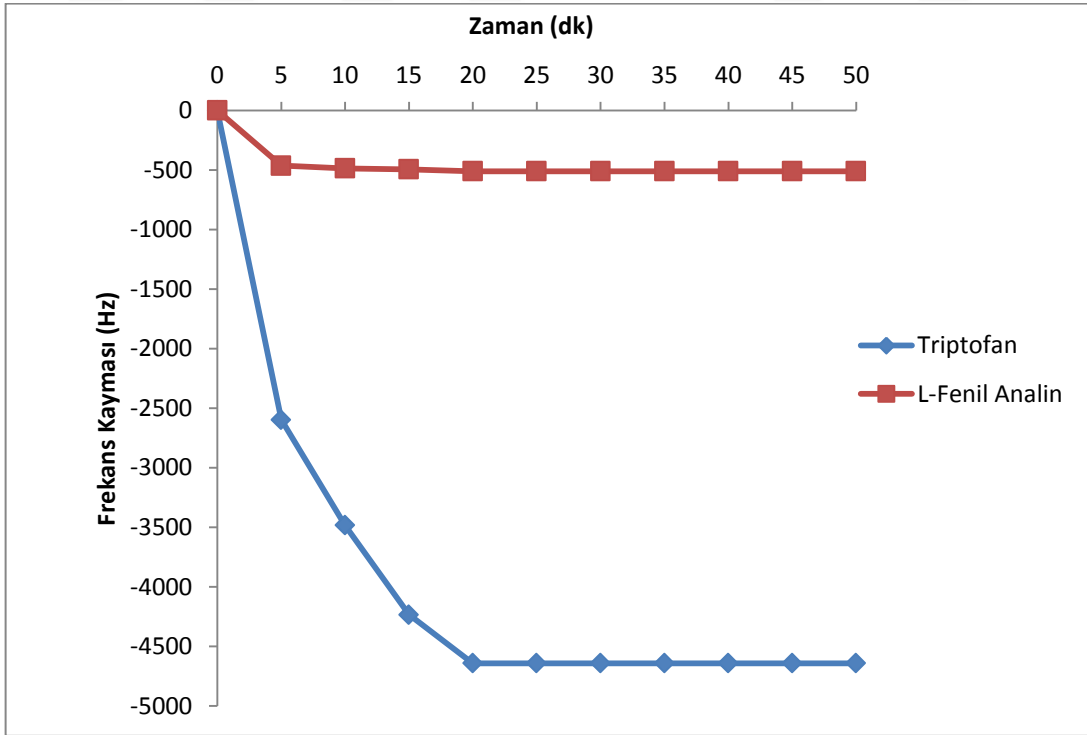
Molekül	Langmuir b (M ⁻¹)	Q _{max} (nmol)	Scatchard K _a (M ⁻¹)	Q _{max} (nmol)
Triptofan	1,42×10 ⁵	5000	109,08×10 ⁷	4,78

4.4. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrotun Seçiciliği

Hedef molekül ve MIP-QCM nanosensörün, metal-şelat bağlanma bölgeleri arasında meydana gelen etkileşimin seçiciliğinin gözlenebilmesi için triptofan moleküler yapısına benzeyen fenil alaninin (Şekil 4.10.b), baskılanmış kuartz kristal nanosensör üzerine adsorpsiyonları araştırılmıştır. 100 μM 'lik fenil alanin çözeltisi ile triptofan baskılanmış polimer, 1 gün süre ile etkinleştirilmiştir. Bu etkileşimin sonucu Şekil 4.11 ve Çizelge 4.2 'de gösterilmiştir. Triptofan baskılanmış sensörün fenil alanine oranla 9 kat daha seçici olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 10. (a) Triptofan (b) Fenil alaninin kimyasal yapısı



Şekil 4.11. Triptofan baskılı sensörün triptofan ve fenil alanin için frekans değerleri (100 μM için)

Sonuçlardan da görüldüğü gibi triptofan baskılı polimerin, triptofan için daha yüksek seçiciliği olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Triptofan baskılı polimerin seçiciliği

	Q (mg/g) (baskılanmış)	Q (mg/g) (baskılanmamış)	k (baskılanmış)	k (baskılanmamış)	k'
Triptofan	62,86	4,87	-	-	-
Fenil alanin	6,92	3,66	9,08	1,33	6,8

4.5. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrot ile Gerçek Numunelerde Triptofan Tayini

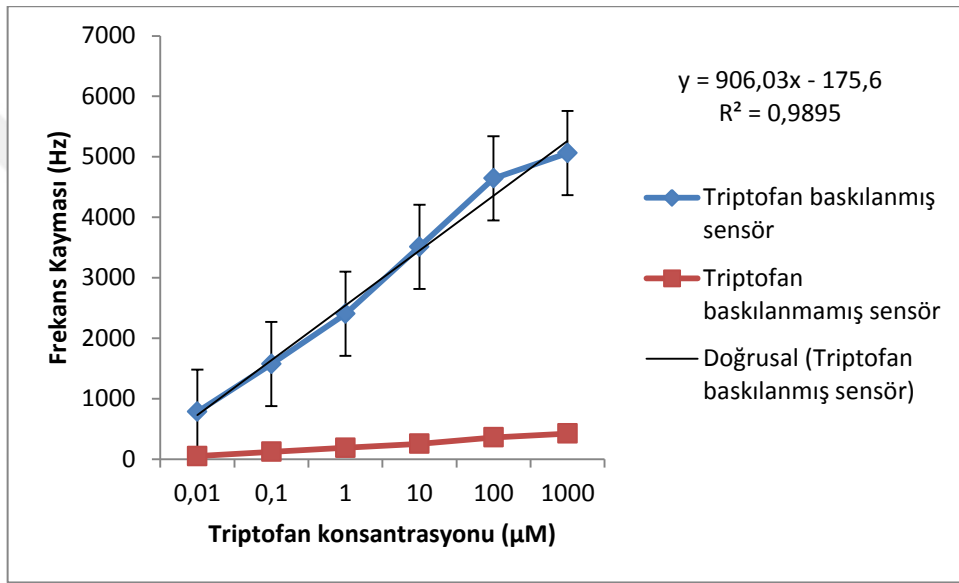
Gerçek numunelerde triptofan analizi için süt, muz, susam ve fıstık numunelerinin, triptofan baskılanmış QCM elektrotla etkileşiminde ortaya çıkan frekans kaymaları ve Şekil 4.12’de verilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplanan sonuçlar Çizelge 4.3’te görülmektedir.

Çizelge 4.3. Gerçek numune analiz sonuçları

Numune	Frekans kayması (Hz)	Triptofan derişimi (nM)	Triptofan miktarı (mg/100g)	Literatür verileri (mg/100g)
Süt	1244	62.7	82	80 (Rambali ve ark., 2002)
Muz	789	10.7	14	10 (Rambali ve ark., 2002)
Yer fıstığı	1701	241	315	330 (www.turkomp.gov.tr)
Susam	1734	276.9	362	370 (Rambali ve ark., 2002) 350 (www. turkomp.gov.tr)

4.6. Triptofan Baskılanmış QCM Elektrotun Analitik Performans

Triptofan baskılı kuartz kristalin, triptofan derişim değerlerine karşılık frekans kayması değerleri sonucu ortaya çıkan kalibrasyon grafiği Şekil 4.12’de gösterilmektedir. Triptofan 0,01 ile 1000 μM derişim aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir ve triptofan baskılanmış kuvars kristalin tayin limiti 8,3 nM’dır. Triptofan derişimi ile frekans kayması değerlerinin doğru orantılı olduğu görülmektedir. Doğrunun R^2 değeri 0,9895 olarak bulunmuştur. Deneyler c tekrarlı yapılmıştır. Her bir veri seti başına ortalama değerler ve standart sapmayı hesaplamak için standart istatistiksel teknikler kullanılmıştır. Güven aralığı % 95 tutulmuştur.



Şekil 4.12. Triptofan baskılı sensör için kalibrasyon grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmamızda, MAH-Cu(II) metal şelat monomeri ile MAH-Cu(II)-Tryptofan metal şelat monomeri, ön organize monomer sistemi ile hazırlanmış ve bu sistem kullanılarak moleküler baskılanmış polimerler QCM elektrot yüzeyinde nanomolar seviyelerinde triptofan algılamak için nanosensör hazırlanmıştır. Bu nanosensör, farklı gıda numunelerindeki triptofan miktarını belirlemek için kullanılmıştır. Ölçüm sonuçlarına bakılarak, moleküler tanıma açısından önemi incelenmiştir.

MAH monomeri FTIR ile karakterize edilmiştir. FTIR spektrumu incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bantları 1710 ve 1629 cm^{-1} de ve amid II gerilme titreşim bandı 1529 cm^{-1} de saptanmıştır.

MAH-Cu(II) metal-şelat monomerinin karakterizasyonu için kullanılan FTIR analizlerinin karakteristik pikleri ise şöyledir: FTIR: $\nu (\text{cm}^{-1}) = 3400$ ile 3250 (-CONH-); 1680 (C=O karbonil gerilme); 1250 (C-O gerilme); 498 (Cu-N gerilme, zayıf bant). Burada, MAH monomerinin 1710 cm^{-1} de görülen karbonil bandının 1680 cm^{-1} e kaydığı görülmektedir. Ayrıca 498 cm^{-1} de görülen Cu-N etkileşim bandı da bakır iyonlarının MAH monomeri ile etkileşime girdiğini kanıtlamaktadır.

MAH-Cu(II)-Tryptofan ön organizasyon sisteminin FTIR karakterizasyonu incelendiğinde, $1150-1400 \text{ cm}^{-1}$ deki çıkan pikler, triptofandan gelen C-N etkileşiminin gerçekleştiğini göstermektedir.

QCM elektrotun altın yüzeyinin morfolojisi, atomik güç mikroskobu (AFM) kullanılarak incelenmiştir. Elektrotun yüzeyi allil merkaptan ile modifikasyona tabi tutulduktan sonra Au-S halinin ve polimerizasyondan sonraki Au-S-Polimer halinin yüzey karakterizasyonu incelenmiştir. Yüzey morfolojisindeki değişiklikler, yüzeyde modifiyenin meydana geldiğini ve yüzeyde polimerizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

Scatchard ve Langmuir yöntemleri kullanılarak triptofan baskılanmış QCM nanosensörün affinite sabitleri bulunmuştur. QCM nanosensöre triptofan bağlanması için yapılan hesaplamalarda Scatchard bağlanma sabiti (K_a) $109,08 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, Q_{max} $4,78 \text{ nmol}$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen grafiğin R^2 değeri çok küçük çıkmış ve aynı zamanda doğrusal olmadığından bağlanma sabiti (K_a) ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı (Q_{max}) net olarak hesaplanamamıştır. Bundan dolayı triptofan baskılı moleküler baskılanmış polimer sensörünün Scatchard analizi için uygun olduğu söylenemez.

Buradan hareketle, tek tabakalı adsorpsiyon ve çözültiden adsorpsiyon için kullanılan Langmuir analizi yapılmış ve triptofan baskılanmış polimer ile QCM ölçümleri sonucunda, triptofan baskılı QCM nanosensöre triptofan bağlanması için Langmuir bağlanma sabiti (b) $1,42 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, Q_{\max} 5000 nmol olarak hesaplanmıştır. Langmuir bağlanma sabiti değerinin de yüksek olması bağlanma bölgelerindeki afinitenin hayli kuvvetli olduğunu gösterir.

Nanosensörün seçiciliğinin anlaşılması için yapılan çalışmada triptofan moleküler yapısına benzeyen L-fenil alanin ile çalışılmış ve triptofan baskılı kuartz kristal nanosensör üzerine adsorpsiyonları incelenmiştir. Sentezlenen nanosensörün triptofan için, L-fenil alanine oranla 9 kat daha fazla seçici olduğu görülmüştür. Triptofan baskılı kuartz kristalin tayin $8,3 \text{ nM}$ 'dir.

Gerçek numuneler için yapılan çalışmalar için seçilen süt, susam, fıstık ve muzdan alınan numunelerin triptofan baskılanmış QCM elektrotla etkileştirilmesi ile ortaya çıkan frekans kaymaları ve Şekil 4.12'de verilen kalibrasyon grafiğinden elde edilen konsantrasyon miktarları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelge 4.3'te verilen gıda numunelerinde gerçekleştirilmiş, analiz sonuçlarına bakıldığında, triptofan baskılı QCM sensörden elde edilen sonuçların diğer literatürdeki yapılmış analiz sonuçlarını destekler nitelikte olduğu görülmüştür. Sonuçların kıyaslanmasıyla, MIP temelli QCM nanosensörün başarılı bir şekilde hazırlandığı ve gerçek numune analizi için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Yaptığımız çalışmada hazırladığımız triptofan baskılı QCM nanosensör, düşük tayin limiti, yüksek seçiciliği ve gerçek numunelere uygunluğu bakımından, ileride patenti alınarak, özellikle gıda laboratuvarlarında sağlık açısından çok önemli bileşiklerden biri olan triptofan tayininde kullanılmak üzere, daha ucuz ve kullanımı kolay bir yöntem olarak geliştirilebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Ackay, G.M., Forrest, C.M., Stoy, N., Christofides, J., Egerton, M., Stone, T.W., Darlington, L.G., 2006. Tryptophan Metabolism and Oxidative Stress in Patients With Chronic Brain Injury, *Eur. J. Neurol.*, 13, 30–42.
- Apodaca, D. C., Pernites, R. B., Ponnepati, R. R., Del Mundo, F. R., and Advincula, R. C., 2010. Electropolymerized Molecularly Imprinted Polymer Films of a Bis-Terthiophene Dendron: Folic Acid Quartz Crystal Microbalance Sensing, *ACS Appl. Mater. Interface*, dx.doi.org/10.1021/am100805y.
- Anderson, L.I., Miyabayashi, A., O'Shannessy, D.J. ve Mosbach, K., 1990. Enantiomeric Resolution of Amino Acid Derivatives on Molecular Imprinted Polymers as Monitored by Motantiometric Measurements, *J. Chromotogr. A.*, 516, 323-331.
- Ayhan F., Tabrizi A. ve Ayhan H., 2011. Microgravimetric DNA Detection with Gold Nanoparticle Immobilized Piezo Crystal by Quartz Crystal Microbalance, *Sensor Letteres*, 9, 1-7.
- Beitollahi, H., Taher, M.A. ve Hosseini A., 2014. Fabrication of a Nanostructure-based Electrochemical Sensor for Simultaneous Determination of Epinephrine and Tryptophan, *Measurement*, 51, 156-163.
- Budisa, N., Rubini, M., Bae, J.H., Weyher, E., Wenger, W., Golbik, R., Huber, R. ve Moroder, L., 2002. Global Replacement of Tryptophan With Amino-tryptophans Generates Non-invasive Protein-based Optical pH Sensors, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 4066–4069.
- Bunte, G., Hürtten, J., Pontius, H., Hartlieb, K. ve Krause, K., 2007. Gas Phase Detection of Explosives Such as 2,4,6-trinitrotoluene by Molecularly Imprinted Polymers, *Analytica Chimica Acta*, 591(1), 49-56.
- Cazes, J., 2006. Handbook of Affinity Chromatography, *Taylor & Francis Group*, 2. Baskı.
- Cormack, P.A.G. ve Elorza, A.Z., 2004. Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis and Characterisation, *Journal of Chromatography B*, 804, 173-182.
- Cormack, P.A.G. ve Mosbach, K., 1999. Molecular Imprinting: Recent Developments and the Road Ahead, *React. Funct. Polym.*, 41, 115-124.
- D'Souza, O. J., Mascarenhas R.J., Thomas T., Namboothiri, I.N.N., Rajamathi M., Martis P. ve Dalhalla J., 2013. Electrochemical Determination of L-Tryptophan Based on a Multiwall Carbon Nanotube/Mg–Al Layered Double Hydroxide Modified Carbon Paste Electrode as a Sensor, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 704, 220–226.
- Davies, M.P., De Biasi, V. ve Perrett, D., 2004. Approaches to the Rational Design of Molecularly Imprinted Polymers, *Anal Chim Acta*, 504, 7-14.
- Dickert, F.L. ve Hayden, O., 1999. Imprinting With Sensor Development on the Way to Synthetic Antibodies, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364, 506–511.

- Diem, S., Bergmann, J. ve Herderich, M., 2000. Tryptophan-N-glucoside in Fruits and Fruit Juices, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4913–4917.
- Diltemiz, S.E, 2006. DNA'yı Tanıma Bölgelerine Sahip Moleküler Baskılanmış Polimer Tekniğine Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi, *Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Eskişehir.
- Diltemiz, S., Hür, D., Ersöz, A., Denizli, A. ve Say, R., 2009. Designing of MIP Based QCM Sensor Having Thymine Recognition Sites Based on Biomimicking DNA Approach, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 599-603.
- Dmitrienko, S.G., Irkha, V.V., Kuznetsova, A.Y. ve Zolotov, Y.A.,2004. Use Of Molecular Imprinted Polymers for the Separation and Preconcentration of Organic Compound, *Journal Of Analytical Chemistry*, 59(9), 808-817.
- Dong, X.C., Sun, H., Lu, X.Y., Wang, H.B., Liu, S.X. ve Wang, N., 2002. Separation of Ephedrine Stereoisomers by Molecularly Imprinted Polymers Influence of Synthetic Conditions and Mobile Phase Compositions on the Chromatographic Performance, *Analyst.*, 127, 1427-1432.
- Ersöz A., Denizli A., Özcan A. ve Say R.,2005. Molecularly Imprinted Ligand-Exchange Recognition Assay of Glucose by Quartz Crystal Microbalance, *Biosensors and Bioelectronics*, 20(11), 2197-2202.
- Fiorucci, A.R., Cavalheiro, E.T.G.,2002. The Use of Carbon Paste Electrode in the Direct Voltammetric Determination of Tryptophan in Pharmaceutical Formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(5), 909–915.
- Friedman, M. ve Cuq J.L., 1988. Chemistry Analysis, Nutritional Value and Toxicology of Tryptophan in Food, *J. Agric. Food Chem.*, 36, 1079–1093.
- Goyal, R.N., Bishnoi, S., Chasta, H., Aziz, M.A. ve Oyama, M., 2011. Effect of Surface Modification of Indium Tin Oxide by Nanoparticles on the Electrochemical Determination of Tryptophan, *Talanta*, 85(5), 2626– 2631.
- Gönen, S., 2006. Karbonhidrat/Amino Asit Baskılanmış Akrilik Polimerlerin Hücre Biyoteknolojisindeki Kullanım Potansiyelinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimler Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi*, Ankara.
- Guan, G., Liu, B., Wang, Z. ve Zhang, Z., 2008. Imprinting of Molecular Recognition Sites on Nanostructures and Its Application in Chemosensor, *Sensors*, 8, 8291-8320,
- Gültekin, A., 2009. Sentetik Reseptörlere Dayalı Nano Algılama Sistemleri, *Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi*, Edirne.
- Haupt, K. ve Ye, L., 2004. Molecularly Imprinted Polymers as Antibody and Receptor Mimics for Assays, Sensors and Drug Discovery, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 1887-1897.
- Heising, R.A., 1946. Quartz Crystals for Electrical Circuits, *Their Design and Manufacture*, Van Nostrand, 536 s, New York.

- Holthoff, E.L. ve Bright, F.V., 2007. Molecularly Templated Materials in Chemical Sensing, *Anal. Chim. Acta*, 594, 147-161.
- Huang, G.G., Cheng, M.L. ve Yang, J., 2011. Metal Ion-Assisted Infrared Optical Sensor for Selective Determination of Tryptophan in Urine Samples, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 58, 435-442.
- Hussain, M., Iqbal, N. ve Lieberzeit, P.A., 2013. Acidic and Basic Polymers for Molecularly Imprinted Folic Acid Sensors-QCM Studies with Thin Films and Nanoparticles, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 176, 1090-1095.
- Ikegami, T., Mukawa, T., Nariai H. ve Takeuchi, T., 2004. Bisphenol A-Recognition Polymers Prepared by Covalent Molecular Imprinting, *Anal. Chim. Acta.*, 504, 131-135.
- Kanazawa, K., ve Cho, N.J., 2009. Quartz Crystal Microbalance as a Sensor to Characterize Macromolecular Assembly Dynamics, *Journal of Sensors*, 2009.
- Karanfil, G., 2013. Kafeik Asit için QCM Nanasensör Hazırlanması, *Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı*, Konya.
- Karimi-Maleh, H., Moazampour M., Ahmar H., Beitollahi H. ve Ensafi A. A., 2014. A Sensitive Nanocomposite-based Electrochemical Sensor for Voltammetric Simultaneous Determination of Isoproterenol, Acetaminophen and Tryptophan, *Measurement*, 51, 91-99.
- Katz, A. ve Davis, M. E., 1999. Investigations into the Mechanisms of Molecular Recognition With Imprinted Polymers, *Macromolecules*, 32, 4113-4121.
- Kochen, W. ve Steinhart, H., 1994. *L-Tryptophan – Current Prospects in Medicine and Drug Safety*, Walter de-Gruyter, 458 p, Berlin.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. ve Asanuma, H., 2003. Molecular Imprinting :From Fundamentals To Applications, *Wiley-VCH Verlag*, New York.
- Kriz, D., Ramstrom, O. ve Mosbach, K., 1997. Molecular Imprinting: New Possibilities for Sensor Technology, *Anal. Chem.*, 69, 345-349.
- Li, H., Li, F., Han, C., Cui, Z., Xie, G. ve Zhang, A., 2010. Highly Sensitive and Selective Tryptophan Colorimetric Sensor Based on 4,4-bipyridine-Functionalized Silver Nanoparticles, *Sensors and Actuators B: Chemical* 145, 194-199.
- Lian, W., Ma, D.J., Xu, X., Chen, Y. ve Wu, Y.L., Rapid High-performance Liquid Chromatography Method for Determination of Tryptophan in Gastric Juice *Journal of Digestive Diseases*, 13(2), 100-106.
- Lin, C.C. ve Liu, H.S., 2000. Adsorption in a Centrifugal Field: Basic Dye Adsorption by Activated Carbon, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39 (1), 161-167.

- Lin, T., Hu, C. ve Chou, T., 2004. Determination of Albumin Concentration by MIP-QCM Sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 75-81.
- Liu, F., Liu X., Siu-Choon Ng, Hardy ve Sze-On C., 2006. Enantioselective Molecular Imprinting Polymer Coated QCM for the Recognition of L-tryptophan, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113(1), 234–240.
- Malone, M.L., Zuo, H., Smyth, M.R.ve Lunte, S.M.,1995. Determination of Tryptophan and Kynurenine in Brain Microdialysis Samples by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *J. Chromatogr. A.*, 700, 73–80.
- Mao, S., Li,W., Long, Y., Tu,Y. ve Deng A., 2012. Sensitive Electrochemical Sensor of Tryptophan Based on Ag@C Core–Shell Nanocomposite Modified Glassy Carbon Electrode, *Analytica Chimica Acta*, 738, 35-40.
- Mazloun-Ardakani, M., Beitollahi, H., Amini, M.K., Mirkhalaf, F. ve Mirjalili,B.F., 2011. A Highly Sensitive Nanostructure-based Electrochemical Sensor for Electrocatalytic Determination of Norepinephrine in the Presence of Acetaminophen and Tryptophan, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2102–2106.
- Miller, J.E. C., Grădinaru, B.R. Crane, Di Bilo, A.J., Wehbi, W.A., Un, S., Winkler, J.R., Gray, H.B., 2003. Spectroscopy and Reactivity of a Photogenerated Tryptophan Radical in a Structurally Defined Protein Environment, *J. Am. Chem. Soc.*,125, 14220–14221.
- Molinelli A., 2004. Molecularly Imprinted Polymers: Towards a Rational Understanding of Biomimetic Materials, *Georgia Institute of Technology, In Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree Doctor of Philosophy in Chemistry*, Atlanta.
- Moranta D., Barceló P., Aparicio S., Garau C., Sarubbo F., Ramis M., Nicolau, C. ve Esteban S., 2014. Intake of Melatonin Increases Tryptophan Hydroxylase Type 1 Activity in Aged Rats: Preliminary Study, *Experimental Gerontology*, 49, 1-4.
- Mosbach, K. ve Ramström, O., 1996. The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology, *Biotechnology*, 14, 163-170.
- Nussbaum, F. V., 2003. Stephacidin B—a New Stage of Complexity Within Prenylated Indole Alkaloids From Fungi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 3068–3071.
- O'Sullivan, C.K. ve Guilbault, G.G., 1999. Commercial Quartz Crystal Microbalances Theory and Applications, *Biosens. Bioelectron*, 14, 663–670.
- Özer, A., 2004. Adsorpsiyon Kinetikleri Ders Notları, *Mersin Üniversitesi, Kimya Bölümü*, Mersin.
- Piacham, T., Josell, A., Arwin, H., Prachayasittikul, V. ve Ye, L., 2005. Molecularly Imprinted Polymer Thin Films on Quartz Crystal Microbalance Using a Surface Bound Photo-radical Initiator, *Analytica Chimica Acta*, 536, 191-196.
- Piletsky, S. A., Alcock, S.ve Turner, A.P.F., 2001. Molecular Imprinting: At the Edge of the Third Millennium, *Trends Biotechnol.*, 19, 9-12.

- Piletsky, S.A. ve Turner, A.P.F., 2002. Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers, *Electroanalysis*, 14, 317-323.
- Rambali B., Van Andel I., Schenk E., Wolterink G., van de Werken G., Stevenson H. ve Vleeming W., 2002. The Contribution of Cocoa Additive to Cigarette Smoking Addiction, *RIVM. The National Institute for Public Health and the Environment*, Netherlands.
- Ralf, L., Carsten, B. ve Peter H., 2000. Gravimetric and Non-gravimetric Chemical Quartz Crystal Resonators, *Sensors and Actuators B.*, 65, 277-283.
- Ramstrom, O., Ye, L. ve Mosbach, K., 1996. Artificial Antibodies to Corticosteroids Prepared by Molecular Imprinting, *Chem. Biol.*, 3, 471-477.
- Rao, T.P., Daniel, S.ve Gladis, J.M., 2004. Tailored Materials for Preconcentration or Separation of Metals by Ion-imprinted Polymers for Solid-phase Extraction (IIP-SPE), *Trends. Anal. Chem.*, 23, 28-35.
- Reynolds, D.M., 2003. Rapid and Direct Determination of Tryptophan in Water Using Synchronous Fluorescence Spectroscopy, *Water Research*, 37, 3055–3060.
- Rodoplu, D., 2011, Biyosensör Uygulamalarına Yönelik Olarak Kuvars Kristal Mikroterazi Yüzeylerin Elektro-eğirme Yöntemi ile Modifikasyonu, *Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı*, Ankara.
- Schäfergen, H., 2004. Vergleich von Akustischen Mikrosensoren mit Makromolekularer Beschichtung für die Gasanalytik, *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*, Bonn.
- Sellergren, B., Lepistö, M. ve Mosbach, K., 1988. Highly Enantioselective and Substrate-selective Polymers Obtained by Molecular Imprinting Utilizing Non-covalent Interaction-NMR and Chromatographic Studies on the Nature of Recognition, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5853-5860.
- Shahrokhian S., ve Bayat M., 2011. Pyrolytic Graphite Electrode Modified with a Thin Film of a Graphite/diamond Nano-mixture for Highly Sensitive Voltammetric Determination of Tryptophan and 5-hydroxytryptophan, *Microchim. Acta*, 174(3), 361–366.
- Shea KJ. ve Dougherty TK., 1986. Molecular Recognition on Synthetic Amorphous Surfaces. The Influence of Functional Group Positioning on the Effectiveness of molecular recognition, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 1091
- Sönmezler, M., 2011. Kuartz Kristal Mikroterazi (QCM) Temelli Histidin Sensörler, *Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Ankara.
- Sözmen N.N., 2008. Biyomedikal Uygulamalarında Akıllı Polimer Kullanılması ve Karakterizasyon Yönteminin Kuvars Kristal Mikro Dengeleyici Sistemler ile Geliştirilmesi, *Yüksek Lisans Tezi, Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Spivak, D.A., 2005. Optimization, Evaluation, and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1779-1794.

- Srivastava A.K., and Sakthivel P., 2001. Quartz-crystal Microbalance Study for Characterizing Atomic Oxygen in Plasma Ash Tools, *Vac. Sci. Technol*, 19, 97-100.
- Steinke, J., Sherrington, D. ve Dunkin, I., 1995. Imprinting of Synthetic Polymers Using Molecular Templates, *Adv. Polym. Sci.* 123, 80-125.
- Stephenson, C.J. ve Shimizu, K.D., 2007. Colorimetric and Fluorometric Molecularly Imprinted Polymer Sensors and Binding Assays, *Polym. Int.*, 56, 482-488.
- Szunerits S., Coffinier Y., Galopin E., Brenner J. ve Boukherroub R., 2010. Preparation of Boron-doped Diamond Nanowires and Their Application for Sensitive Electrochemical Detection of Tryptophan, *Electrochemistry Communications*, 12(3), 438–441.
- Uçan, M., 2002. Co (II) Komplekslerinin Ligand Adsorpsiyonlarının İncelenmesi ve Adsorpsiyon Parametrelerinin Belirlenmesi, *Doktora Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Niğde.
- Wang Q., Vasilescu A., Subramanian P., Vezeanu A., Andrei V., Coffinier Y., Li M., Boukherroub R. ve Szunerits S., 2013. Simultaneous Electrochemical Detection of Tryptophan and Tyrosine Using Boron-doped Diamond and Diamond Nanowire Electrodes, *Electrochemistry Communications*, 35, 84–87.
- Wang, J., 1997. Remote Electrochemical Sensors for Monitoring Inorganic and Organic Pollutants, *Trends Anal. Chem.*, 16, 84-88.
- Whitaker-Azmitia P.M., 2005. Behavioral and Cellular Consequences of Increasing Serotonergic Activity During Brain Development: A Role in Autism?, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(1), 75–83.
- Wulff, G., Vesper, W., Grobe-Einsler, R. Ve Sarhan, A. 1977. Enzyme-analogue Built Polymers- on the Synthesis of Polymers Containing Chiral Cavities and Their use for the Resolution of Racemates, *Makromolekular Chemistry*, 178, 2799-2816.
- Y. Fan, Liu, J.-H., Lu, H.-T. ve Zhang, Q., 2011. Electrochemistry and Voltammetric Determination of L-tryptophan and L-tyrosine Using a Glassy Carbon Electrode Modified with a Nafion/TiO₂-graphene Composite Film, *Microchim. Acta*, 173(1), 241–247.
- Yao, S.Z., 1997. *Piezoelectric chemo/biosensors*. Hunan Normal University Press, 386-90 pp, Changsha, China.
- Yavuz, H., Karakoc, V., Turkmen, D., Say, R. ve Denizli A., 2006. Synthesis of Cholesterol Imprinted Polymeric Particles, *Int. J. Biol. Macromol.*, 41, 8-15.
- Yu, C. ve Mosbach, K., 1997. Molecular Imprinting Utilizing an Amide Functional Group for Hydrogen Bonding Leading to Highly Efficient Polymers, *J. Org. Chem.*, 62, 4057-4064.

- Zhang W., Chai Y., Yuan R., Chen S., Han J. ve Yuan D., 2012. Facile Synthesis of Graphene Hybrid Tube-like Structure for Simultaneous Detection of Ascorbic Acid, Dopamine, Uric Acid and Tryptophan, *Analytica Chimica Acta*, 756, 7–12.
- Zhang, K., Zhang, N., Cai, H. ve Wang, C., 2012. A Novel Non-enzyme Hydrogen Peroxide Sensor Based on an Electrode Modified With Carbon Nanotube-wired CuO Nanoflowers, *Microchimica Acta*, 176, 137–142.
- Zhang, L., Li, Y., Zhou, H., Li, L., Wang, Y. ve Zhang, Y., 2012. Determination of Eight Amino Acids in Mice Embryonic Stem Cells by Pre-column Derivatization HPLC with Fluorescence Detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66, 356–358.
- Zhao, J., Chen H., Ni P., Xu B., Luo X., Zhan Y., Gao P. ve Zhu D., 2011. Simultaneous Determination of Urinary Tryptophan, Tryptophan-related Metabolites and Creatinine by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet and Fluorimetric Detection, *Journal of Chromatography B*, 879(26), 2720–2725.
- Zhou, W., Tang, S., Yao, Q., Chen, F., Yang, H. ve Wang, X., 2010. A Quartz Crystal Microbalance Sensor Based on Mussel-inspired Molecularly Imprinted Polymer, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 585–589.
- Zhu, W., Stevens, A.P., Dettmer, K., Gottfried, E., Hoves, S., M. Kreutz, Holler, E., Canelas, A.B., Kema, I. ve Oefner, P.J., 2011. Quantitative Profiling of Tryptophan Metabolites in Serum, Urine, and Cell Culture Supernatants by Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry, *Analytical and Bio-analytical Chemistry*, 401(10), 3249–3261.

www.turkomp.gov.tr

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Abdulkadir ÜNÜVAR
Doğum Tarihi ve Yer : 09.09.1985-Karaman
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0544 317 7677
e-mail : unuvarabdulkadir@gmail.com

Eğitim:

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü	2007
Lise	Karaman Fatih Lisesi	2002

İş Deneyimi:

Yıl	Yer	Görev
2007-2008	Çatalbadem İlköğretim Okulu	Öğretmen
2008-2009	Yunuskent Lisesi	Öğretmen
2010-2011	Dursunbey Çok Programlı Lisesi	Öğretmen
2011-2012	Siverek Türk Telekom Lisesi	Öğretmen
2012-2014	Bifa Anadolu Lisesi	Öğretmen
2014-	Abdullah Tayyar Anadolu Lisesi	Müdür Yardımcısı