

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**UYUŞTURUCULARIN/BAĞİMLİLİK YAPAN MALZEMELERİN
TEST EDİLMESİ/ANALİZİ İÇİN MİKRO/NANO PLATFORMLAR
OLARAK YÜZEY MODİFİYE KALEM GRAFİT ELEKTROTLAR
(PGE'LER)**

HAZIRLAYAN

BESTE SAHRA CİHANGİROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA - 2021

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**UYUŞTURUCULARIN/BAĞIMLILIK YAPAN MALZEMELERİN
TEST EDİLMESİ/ANALİZİ İÇİN MİKRO/NANO PLATFORMLAR
OLARAK YÜZEY MODİFİYE KALEM GRAFİT ELEKTROTLAR
(PGE'LER)**

HAZIRLAYAN

BESTE SAHRA CİHANGİROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŐMANI

PROF.DR.EMİR BAKİ DENKBAŞ

ANKARA – 2021

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Beste Sahra Cihangiroğlu tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13 / 08 / 2021

Tez Adı: Uyuşturucuların/ bağımlılık yapan malzemelerin test edilmesi/analizi için mikro/nano platformlar olarak yüzey modifiye kalem grafit elektrotlar (PGE'ler)

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı-Soyadı, Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Ahmet abuk, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

.....

Prof. Dr. İsmail Cengiz Kocum, Başkent Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş, Başkent Üniversitesi

.....

ONAY

Prof. Dr. Ömer Faruk ELALDI
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih: / /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 29/ 08/ 2021

Öğrencinin Adı, Soyadı: Beste Sahra CİHANGİROĞLU

Öğrencinin Numarası: 21820191

Anabilim Dalı: Biyomedikal Mühendisliği

Programı: Biyomedikal Mühendisliği

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Tez Başlığı: Uyuşturucuların/bağımlılık yapan malzemelerin test edilmesi/analizi için mikro/nano platformlar olarak Yüzey Modifiye Kalem Grafit Elektrotlar (PGE'ler)

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 44 sayfalık kısmına ilişkin, 29/ 08/ 2021 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

29/ 08/ 2021

Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

Bu tez çalışmamı, Emniyet Genel Müdürlüğü Narkotik Şube Biriminde yıllarını büyük bir fedakârlıkla geçiren ve özellikle çocuklarımızın daha güvenli bir ortamda olması için çalışan polislerimize ithaf ediyorum.

Beste Sahra CİHANGİROĞLU

Ankara - 2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle beni destekleyen, her zaman bir baba gibi davranıp, anlayış gösteren, farklı bakış açıları kazanmamı sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen, akademik bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren Doç. Dr. Betül Bozdoğan'a, Doç. Dr. Tayfun Vural'a ve Gizem Daban'a : deneysel çalışmalarında emeğini esirgemeyen Rümeyza Ekici ve Betül Çimen'e teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Deneysel çalışmalarında imkanlarını esirgemeyen Microbiota Biyoteknoloji San. Ve Tic. A.Ş. firmasına teşekkürlerimi sunarım.

Başkent Üniversitesi BAP birimine 2019-289:BA19/FM_20 numaralı projeme vermiş oldukları desteklerden dolayı müteşekkirim.

Lisans ve Yüksek lisans eğitimim boyunca yaptığım tüm çalışmalarda beni destekleyen, tecrübeleriyle bana her zaman ışık tutan Arş.Gör.Aynur Didem Oktan'a: İyi ve kötü günlerimde maddi manevi her zaman yanımda olan ve birlikte zaman geçirmekten çok keyif aldığım Biyomedikal Mühendisi –Mühendis Hanımlar- değerli arkadaşlarım İklim Demirkaynak'a, Hatice Candan'a, Özge Ercan'a ve Sena Akyol'a;tez yazım sürecimde destekleri ve motivasyonlarını esirgemeyen, çalışma tempomun düşmesine izin vermeyen Er&Kut Savunma iş arkadaşlarıma en derin sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doğduğum günden bugüne kadar beni karşılıksız sevgi, emek ve destekleri ile büyüten düştüğümde benimle birlikte toparlanma yolu arayan kararlarıma saygı duyup sonsuz güven ile beni 'Deli Rüzgarların Kadını' yapan birtanecik annem Hacer ve babam Erol Cihangiroğlu'na; hangi koşulda olursa olsun mesafelerin bile ayıramadığı ikinci annem olan sevgili ablam Buse Leyla ve eniştem Ramazan Bozok'a: hayatıma girmesiyle teyzelik sevinci yaşatan biricik yiğenim Duha Gök Bozok'a müteşekkirim...

ÖZET

Beste Sahra CİHANGİROĞLU

**UYUŞTURUCULARIN/BAĞIMLILIK YAPAN MALZEMELERİN TEST
EDİLMESİ /ANALIZI İÇİN MİKRO/NANO PLATFORMLAR OLARAK YÜZEY
MODIFIYE KALEM GRAFIT ELEKTROTLAR (PGE'LER)**

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

2021

Son yıllarda sağlık alanında önemli olan uyuşturucu/bağımlılık yapıcı maddeler sağlık uygulamaları dışında belirli dozun üzerinde vücuda alındığında organizmada farklı nörolojik, fizyolojik ve davranışsal etkilere sahip olan ve alındığında ölüme yol açan önemli sorunlara yol açan maddeler olarak nitelendirilebilmektedir.

Uyuşturucu kullanımı, dağıtımı ve benzeri uygulamalarda bulundurulması suç sayılan bu maddelerle ilgili yasal düzenlemeler geliştirilmiştir. Günümüzde test/analiz ve tarama işlemlerinde son derece hassas sonuçlar veren bazı immünokimyasal (Elisa, EMIT, CEDIA, FPIA) ve kromatografik teknikler (GC-MS, LC-MS/MS) mevcuttur, ancak bunu sağlayan taşınabilir sistemlere ihtiyaç vardır. özellikle saha testleri ve taramalarda hızlı ve doğru sonuçlar her geçen gün artmaktadır. Son yıllarda bu sistemler arasında özellikle elektrokimyasal temelli biyosensörler en çok tercih edilenler olup, hedeflenen ilaçların/benzer maddelerin varlığında elektrokimyasal değişiklikleri farklı prensiplere göre (voltametrik, amperometrik veya kondüktometrik gibi) ölçebilmektedir. Bunlar şu anda taşınabilir ve çok kısa sürede saha ölçümleri yapabilen sistemler olarak dikkat çekiyor.

Bu çalışmanın kapsamı, elektrokimyasal tabanlı bir biyosensörde kurşun kalem grafit elektrotlarının (PGE'ler) yüzey modifikasyonudur. Bu kapsamda mikro/nano ölçekli kuyular veya tepeler oluşturularak PGE'lerin yüzey alanları/ölçüm kapasiteleri arttırılmaya çalışılmıştır. Mikro/nano kuyucuklar, ince bir polimerik film ile nefes figürü tekniği ile oluşturulur ve mikro/nano tepeler, hidroksiapatit kristallerinin PGE'lerin yüzeylerinde çöktelmesiyle oluşturulur. Daha sonra, PGE'ler bakır sülfat ile işlendi ve mikro/nano platformların NaOH ile bazik koşullarda bakır oksitlerle süslenmesine izin verildi.

Çalışmanın uygulama aşamasında model ilaç düşünölmüş ve bu maddenin fosfat tampon çözeltisi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış ve modifiye edilmiş PGE'ler ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Platformların etkinlik testlerinde, konsantrasyonu bilinmeyen aynı numune kullanılarak nicel ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar değerlendirildi ve özellikle mikro/nano tepelerden oluşan platformun umut verici olduğu anlaşıldı ve bu yöntem kullanılarak gerçek örneklerle çalışmaya devam edilmesine karar verildi.

ANAHTAR KELİMELELER: Nefes Figürü, PGE, Kurşun Kalem Elektrod, Elektrokimyasal Sensörler, Gözenekli Polimerik Yüzeyler, Gözenekli Film Sentezi, Kaplama, Narkotik ajan tayini

ABSTRACT

Beste Sahra CİHANGİROĞLU

**SURFACE MODIFIED PENCIL GRAPHITE ELECTRODES (PGES) AS
MICRO/NANOPLATFORMS TO TEST/ANALYSIS OF DRUGS/ADDICTIVE
MATERIALS**

Baskent University Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biomedical Engineering

2021

In recent years, drugs/addictive substances cause significant health and they can be characterized as substances when taken into the body outside of health applications, have different neurological, physiological and behavioral effects in the organism and lead to significant problems that lead to death when taken above certain doses. Legal regulations have been developed regarding these substances, whose possession in drug use, distribution and similar applications is considered as a crime. Some immunochemical (Elisa, EMIT, CEDIA, FPIA) and chromatographic techniques (GC-MS, LC-MS/MS) that give extremely precise results today in the test/analysis and screening processes are available, but the need for portable systems that provide fast and accurate results, especially in field tests and scans, is growing every day. In recent years, among these systems especially electrochemical based biosensors are most favorable and they can measure electrochemical changes in the presence of targeted drugs/similar substances based on different principles (such as voltametric, amperometric or conductometric). These are currently noteworthy as systems that are portable and can perform field measurements in a very short time.

The scope of this study is surface modification of pencil graphite electrodes (PGEs) in an electrochemical based biosensor. In this context, PGEs were attempted to increase the surface areas/measurement capacities by creating micro/nanoscale wells or hills. Micro/nano wells are formed by the breath figure technique with a thin polymeric film and micro/nano hills are formed by precipitation of hydroxyapatite crystals on PGEs surfaces. Then, PGEs were treated with copper sulfate, allowing the micro/nano platforms to be

decorated with copper oxides in basic conditions with NaOH. In the application stage of the study, a model drug was considered, and solutions of this substance were prepared in different concentrations by using phosphate buffer solution and a calibration curve was obtained with the modified PGEs. In the effectiveness tests of the platforms, quantitative measurements were made by using the same sample which concentration is unknown. The results were evaluated, and it was understood that the platform consisting of micro/nano hills in particular was promising, and it was decided to continue the work with real samples by using this method.

KEYWORDS: Breath Figure, PGE, Pencil Electrode, Electrochemical Sensors, Porous Polymeric Surfaces, Porous Film Synthesis, Coating, Narcotic agent determination

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında Türkiye’de özellikle Emniyet Genel Müdürlüğü Narkotik Şube Biriminin, ihtiyaçlarının ve gereksinimlerinin incelenmesi sonucunda fentanil ajanlarının daha kısa sürede, hızlı ve kesin sonuç verebilecek sensör yapısının geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar ile özellikle ilk ve orta okul önlerinde bekleyerek çocuklarımızı yeni hedef kitlesi haline getiren zehir tacirlerinden korunması hedeflendi.

Bu kapsamda Eskişehir İl Emniyet Genel Müdürlüğü Narkotik Şube Biriminin talebi üzerine Başkent Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş ile 2019 yılında irtibata geçilmiş ve tezin geliştirilmesi sürecinde büyük katkı sağlamıştır.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Madde Bağımlılığı	3
2.1.1. Bağımlılık yapan maddeler: uyuşturucu maddeler	4
2.1.1.1.Merkezi sinir sistemini yavaşlatan depresanlar:	5
2.1.1.2.Uyarıcılar(Stimulanlar).....	5
2.1.1.3.Hayal Gösterenler halusinojenler.....	6
2.1.1.4.Kenevir	6
2.1.1.5.Buharlaşılabilen kimyasal maddeler (Solventler)	6
2.1.2. Uyuşturucu madde analiz yaklaşımları	6
2.1.2.1.Klinik toksikoloji/ tıbbi;	7
2.1.2.2.Adli toksikoloji/ Adli-idari;	7
2.1.2.3.Sosyal;	7
2.1.3. Uyuşturucu madde analiz yöntemleri	8
2.1.3.1.Tarama testleri	9
2.1.1.1.Doğrulama testleri	10
2.2.Biyosensörler	10
2.2.1. Geçmişten günümüze biyosensörler	11
2.2.2. Biyosensör tasarımı.....	12
2.2.2.1.Örnek seçimi ve hazırlanması.....	13
2.2.2.2.Performans artırma parametreleri.....	14
2.2.2.3.Çalışma ortamı	15
2.2.3. Biyosensör çeşitleri.....	15
2.2.3.1.Analizlenecek maddelere göre biyosensörler	15

2.2.3.2. Biyoreaktif reseptörlere göre biyosensörler	16
2.2.3.3. Transduser mekanizmasına göre biyosensörler.....	18
2.2.3.4. Biyosensör uygulamaları	24
2.1.1.1. Ticari biyosensörler	24
3. MATERYAL VE METHOD	26
3.1. Kimyasallar ve Kullanılan Cihazlar	26
3.2. Elektrotların Modifikasyonu	26
3.2.1. Kalem ucu grafit elektrotların hazırlanması.....	26
3.2.1.1. Nefes figürü ile elektrotların kaplanması	27
3.2.1.2. Hidroksiapatit ile kalem ucu elektrotların hazırlanması	27
3.3. Elektrokimyasal Çalışmalar	27
3.3.1. Elektrokimyasal hücre.....	28
3.3.2. Çözeltilerin hazırlanması	28
3.3.3. Elektrokimyasal analiz	29
3.3.3.1. Elektrot davranışlarının incelenmesi	29
3.3.3.2. Nitel analiz	29
3.3.3.3. Nicel analiz.....	29
3.4. Elektrotların Karakterizasyonu.....	29
3.4.1. Morfolojik değerlendirmeleri	29
3.4.2. Elektrot yüzeylerinin kimyasal yapısının karakterizasyonu	30
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	31
4.1. Elektrot Modifikasyonu ve Karakterizasyonu.....	31
4.1.1. Morfolojik inceleme	31
4.1.2. FT-IR incelemeleri	33
4.2. Elektrokimyasal Analiz Sonuçları	35
4.2.1. Dönüşümlü voltametri analiz sonuçları	35
4.2.1.1. Nefes figürü ile modifiye edilmiş elektrotların analizi.....	36
4.2.1.2. HAP birikimi ile modifiye edilmiş elektrotların analizi	37
4.3. Elektrokimyasal Yöntemle Kafein Tayini.....	39
4.3.1. CV ile kafein tayini	39
4.3.2. DPV ile kafein tayini.....	40
5. SONUÇ	43
KAYNAKLAR.....	45

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Uyuşturucu maddelerin sınıflandırılması.....	4
Tablo 2.3 Bağımlılık Belirtileri[19]	9
Tablo 2.4 1970-1995 Biyosensör Tarihi.....	11
Tablo 2.5 Biyosensör Bileşenleri [36],[39].	13
Tablo 2.6 Değişen morfolojik özelliklere göre gözenek yapılarının boyutu [72].	23

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Analiz Yaklaşımları.....	8
Şekil 2.2 Geçmişten günümüze biyosensörler [25].....	12
Şekil 2.3 Biyosensör Yapısı.....	12
Şekil 2.4 Analizlenecek Maddelere göre Biyosensörler.....	15
Şekil 2.5 Biyoaktif Reseptörler Göre Biyosensörler	16
Şekil 2.6 Ölçüm Mekanizmasına göre Biyosensörler	18
Şekil 2.7 Clark oksijen elektrodu [45].....	19
Şekil 2.8 Piezoelektrik Tabanlı Biyosensör Şeması	20
Şekil 2.9 (A) Yıldız PS polimeri / PS-PPP blok kopolimerinin gözenekli -bal peteği-film oluşumunun şematik çizimi; (B) PS-PPP altıgen yapıları filmlerin SEM görüntüsü [64].	22
Şekil 3.1 Elektrokimyasal analizör.....	28
Şekil 4.1 (A) Modifiye edilmemiş elektrod yüzeyi (B) Hidroksisapatit ile modifiye edilmiş elektrod yüzeyi.....	31
Şekil 4.2 0.05M CuSO ₄ *5H ₂ O+0.1M NaOH 1:5 oranında	32
Şekil 4.3 PU+ 0.05M CuSO ₄ *5H ₂ O+0.1M NaOH 1:3 oranında	32
Şekil 4.4 Modifiye edilmemiş kalem grafit elektrodun yüzey FTIR spektrumu.....	33
Şekil 4.5 Poliüretan kullanılarak Breath Figure yöntemi ile modifiye edilen pencil grafit elektrodun FTIR-ATR spektrumu.	34
Şekil 4.6 HAP ile modifiye edilmiş pencil grafit elektrodun FTIR-ATR spektrumu	35
Şekil 4.7 Eşkenar üçgen modifiye edilmemiş kalem ucu elektrotu, üçgen 0.05M CuSO ₄ *5H ₂ O +0.5M NaOH 1:1 çözeltisini, kare 0.05M CuSO ₄ *5H ₂ O +0.1M NaOH 1:5 çözeltisini temsil etmektedir.	36
Şekil 4.8 Eşkenar üçgen modifiye edilmemiş kalem ucu elektrotu, üçgen 0.05M CuSO ₄ *5H ₂ O +0.5M NaOH 1:1 çözeltisini, kare 0.05M CuSO ₄ *5H ₂ O +0.1M NaOH 1:3 çözeltisini temsil etmektedir.	37
Şekil 4.9 Eşkenar üçgen modifiye edilmemiş kalem ucu elektrotu, üçgen 0.05M CuSO ₄ *5H ₂ O +0.5M NaOH 1:5 çözeltisini, kare 0.05M CuSO ₄ *5H ₂ O +0.3M NaOH 1:3 çözeltisini temsil etmektedir.	38

Şekil 4.10 Kafeinin kimyasal yapısı	40
Şekil 4.11 Modifiye edilmiş ve edilmemiş kalem grafit elektrotların 0,5 mM kafein içeren fosfat tampon çözeltisinde Ag/AgCl referans elektroda karşı ölçülen dönüşümlü voltamogramları. (Tarama hızı: 0,05 V s ⁻¹).....	40
Şekil 4.12 HAP ve 0,05 M CuSO ₄ + 0,3 M NaOH 1:5 ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrot ile 0.2 M fosfat tampon (pH 7,4) çözeltisi içerisinde kafeinin artan derişiminlerinin (5-60 µM)diferansiyel puls voltamogramları. Her bir kafein eklemesi 5 µM'dir.	41
Şekil 4.13 Kafein artan derişiminin ölçülen pik akımına karşı grafiği.....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
nm	Nanometre
BF	Nefes Figürü
NAOH	Sodyumperoksit
Elisa	Enzyme-Linked Sorbent İmmunoassay
EMIT,	Enzyme Multiplied IA
CEDIA,	Cloned Enzyme Donor İmmunoassay
FPIA	Fluorescent Polarization IA
GC-MS	Gaz kromatografisi-Kütle kromatografisi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi – Ardışık Kütle Spektroskopisi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
LSD	Poli(Laktik Asit)
DMT	Diethyltryptamine
STP	Serenity Tranquillity Peace
RIA	Radioimmunoassay
KIMS	Kinetic Interaction of Microparticles in Solution
ISFET	İyon Algılayan Transistör
F -	Flor İyonu
I-	İyot İyonu
CN-	Siyanür
Na +	Sodyum İyonu
K+	Potasyum İyonu
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
H +	Hidrojen İyonu
NH ₄	Amonyak
CO ₂	Karbondiyoksit
NH ₃	Amonyak
GCE	Cam Karbon Elektrottan
PS	Polistiren Polimer
CS ₂	Karbon Disülfür
PS/PPP	Poliparafenilen Blok Kopolimerini
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
SEM	Scanning Electron Microscope(Taramalı Elektrom Mikroskopu)
PU	Poliüretan
K ₃ Fe(CN) ₆	Potasyum Ferrisiyanür
K ₄ Fe(CN) ₆	Potasyum Ferrosiyaniür
NaH ₂ PO ₄	Monosodyum Fosfat
Na ₂ HPO ₄	Sodyum Fosfat
H ₃ PO ₄	Fosforik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır(II) Sülfat Pentahidrat
KCl	Potasyum Klorür
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Diamonyum Hidrojen Fosfat
HAP	Hidroksiapatit
Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş Klorür
Fe(CN) ₆ ^{-3/-4}	Ferrisiyanis
g	Gram

CV	Dönüşümlü Voltametri
mL	Mililitre
uM	Mikromolar
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared

1. GİRİŞ

İnsanoğlu varoluşundan bugüne kadar doğaya tarifsiz bir bağlılık içerisinde. Doğanın onlara sunduklarını gözleme-kaydetme-uygulama(dönüştürme) süreçlerinden geçirerek hayatı daha kolay hale getirmeyi kendilerine soyut bir görev haline getirmişlerdir. Yaşamı kolaylaştırmanın en kısa yolu bir hayal ve o hayali gerçekleştirebilecek malzemelere sahip olmaktır. Bu konuda ise en büyük yardımcı olarak doğa görev almaktadır. Bazı buluşlar büyük bir hayal gücüne ve yüksek motivasyona sahip olmayı gerektirir.

Biyomimetik olarak adlandırılan bu sistemlerin kullanım alanları mimariden teknolojiye kadar uzanmaktadır. Başlangıçta sadece yüzeysel olarak taklit mümkün olmuştur. İnsanlar hayvanların dış görünüşlerini ve hareketlerini inceleyerek günlük hayatlarında kullandıkları bir çok şeyi geliştirmiş ve yeni şeyler üretmişlerdir. Tarihteki ilk ve en önemli örneklerinden bir tanesi Velcro Bantlarıdır- Dulavrat otu bitkisinin kıyafetlere yapışmasından esinlenilmiştir-. Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmeler, biyomimetik gelişimlere ışık tutmaktadır. Esas dönüm noktası ise doğanın moleküler boyutta incelenebilmesi olmuştur. Poröz (gözenekli) yapıların- katı bir iskelet içerisinde birbirleri ile irtibatlı boşlukların bulunduğu bir malzeme - görüntülenmesiyle birlikte başlayan çalışmalar bu yapıların birçok farklı alanda kullanılabilirliğini ortaya koymuştur.

Gözenekli ortamlar, günlük hayatımızda yapısal özelliklerinde gözlenen farklılıklardan dolayı her sahada karşımıza çıkmaktadır -deniz kumu, kireçtaşı, odun, çavdar ekmeği, akciğer ve dokuları- . Gözeneklilik oranları, gözeneklerin boyutları, şekilleri ve bükümlülük değerleri kullanım alanını arttırmaktadır. UPAC gözenek boyutu ölçeğine göre gözenekleri mikro gözenekler - <2 nm boyutundakiler- ve makro gözenekler - > 50 nm - olarak ikiye ayrılmaktadır [1]. Mikro boyuttaki poröz yapılar membran, sensör ve iskele yapı olarak kullanılabilir. Gözenekli yapı elde etmenin bir çok yolu vardır.

Sensörler, farklı moleköl ya da moleköl gruplarını ya da fiziksel ortam koşullarını algılayan sistemlerdir[2]. Sensörler işlevsel olarak farklılık gösterse de temel olarak bir algılayıcı, bir dönüştürücü ve bir de kullanıcı ara yüzeyinden oluşmaktadır. Son yıllarda biyolojik moleküllerin algılanması için geliştirilen biyosensör çalışmaları hız kazanmıştır.

Narkotik; morfin, kokain, eroin, esrar vb. uyuşturucu maddelerin ortak adıdır. Vücutta bağımlılık etkisi yapan bu maddeler zamanla bilinç kayıplarının yaşanmasına ve kontrolsüz davranışların sergilenmesine sebep olmaktadır. Günümüzün sosyal-eğitim-

sağlık üçlüsünün en büyük sorunudur. Kullanım yaşının giderek düştüğü bugünlerde narkotik ürünlere erişimde bir o kadar kolaylaşmıştır. Bağımlılık ve kullanım düzeyine bağlı olarak etkileri gözle görüle bildiği dört tür uyuşturucu testi vardır: idrar testi, kan testi, tükürük testi ve saç testi. Standart 5-panel testi amfetaminleri (speed, met, krank, ekstazi), kannabinoidleri (marihuana, kubar), kokaini (kokain, taş), opiatları (eroïn, morfin, afyon, kodein) ve fensiklidini (PCP) ölçer[3]. Ne yazıkki ilkokul önlerinde satışının bile mümkün olduğu bu ürünlerin tespiti zaman aldığı için bir çok kullanıcıya yardım eli uzatmakta geç kalınmaktadır.

Son yıllarda sağlık alanında önemli olan uyuşturucu/bağımlılık yapıcı maddeler sağlık uygulamaları dışında belirli dozun üzerinde vücuda alındığında organizmada farklı nörolojik, fizyolojik ve davranışsal etkilere sahip olan ve alındığında ölüme yol açan önemli sorunlara yol açan maddeler olarak nitelendirilebilmektedir.

Uyuşturucu kullanımı, dağıtımı ve benzeri uygulamalarda bulundurulması suç sayılan bu maddelerle ilgili yasal düzenlemeler geliştirilmiştir. Günümüzde test/analiz ve tarama işlemlerinde son derece hassas sonuçlar veren bazı immünokimyasal (Elisa, EMIT, CEDIA, FPIA) ve kromatografik teknikler (GC-MS, LC-MS/MS) mevcuttur, ancak bunu sağlayan taşınabilir sistemlere ihtiyaç vardır. özellikle saha testleri ve taramalarda hızlı ve doğru sonuçlar her geçen gün artmaktadır. Son yıllarda bu sistemler arasında özellikle elektrokimyasal temelli biyosensörler en çok tercih edilenler olup, hedeflenen ilaçların/benzer maddelerin varlığında elektrokimyasal değişiklikleri farklı prensiplere göre (voltametrik, amperometrik veya kondüktometrik gibi) ölçebilmektedir. Bunlar şu anda taşınabilir ve çok kısa sürede saha ölçümleri yapabilen sistemler olarak dikkat çekiyor.

Bu çalışmanın kapsamı, elektrokimyasal tabanlı bir biyosensörde kurşun kalem grafit elektrotlarının (PGE'ler) yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. PGE'lerin yüzeylerinde mikro/nano kuyucukları ince bir polimerik film ile nefes figürü tekniği ile oluşturduk. Oluşturulan bu çukur-tepe ilişkisi hidroksiapatit kristallerinin PGE'lerin yüzeylerinde çökeltmesiyle oluşturulur. Oluşturulan yapı NaOH'lı ortamda bakır sülfat ile tepkimeye girmesi sağlandı. Platformların etkinlik testlerinde, konsantrasyonu bilinmeyen aynı numune kullanılarak nicel ölçümler yapılmıştır. Elde edilen sonuçların ticarileştirilebilecek bir teknoloji olduğunu göstermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Madde Bağımlılığı

İnsanoğlu varoluşundan bugüne kadar etrafında yer alan canlı/cansız birçok objeye merak duymaktadır. Bu merak duygusu onlar ile bir çeşit bağ kurmasına sebep olmaktadır. Bu bağlanma duygusu tutsaklık veya vazgeçememe durumuna geldiğinde bağımlılık oluşturur. Bağımlılık yapan maddeler; sigara, alkol, kafein, uyuşturucu ve uçucu maddelerdir[4]. Yeşilay Kurumunun tanımına göre madde bağımlılığı “vücudun fonksiyonlarını yerine getirirken doğrudan ya da dolaylı olarak işlevlerini olumsuz yönde etkileyen maddelerin kullanılması ve zarar gördüğünün bilincinde olunmasına rağmen bu maddelerin kullanımının bırakılmaması” olarak açıklamıştır[5]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ise; “kişinin şiddetli istek ve arzuları karşısında, kullandığı madde miktarının arttırarak kullanma eğilimi göstermesi halinde ruhsal ve fiziksel olarak bağımlılık yapan maddeler” olarak açıklamıştır[7]. Tüm dünyada büyük tehdit oluşturan madde bağımlılığının belli başlı faktörleri;

*Yaş: Yapılan araştırma sonuçlarına göre uyuşturucu madde ile ilk tanışma zaman diliminin ergenlik çağı olduğu gözlenmiştir[8].

*Cinsiyet: Araştırma sonuçlarına göre erkek bireylerin kadınlara nazaran daha meyilli olduğu görülmektedir[9].

*Sosyoekonomik Durum: Özel okullarda madde kullanımının yaygınlığı sağlık bakanlığının yaptığı araştırmalarda gözler önüne serilmektedir [6], [10].

* Arkadaş Çevresi: Yapılan araştırmalarda gençlerin arkadaşlarında etkilendikleri ve ilk uyuşturucu madde ile arkadaşları vasıtası ile tanıştığı raporlarda gözlenmektedir [11].

Ayrıca, kişinin yaşam koşulları, aile içi iletişimi, sigara ve/veya alkol tüketimi, psikolojik sağlığı gibi etmenlerde madde bağımlılığını tetiklemektedir[6].

Madde bağımlılığı karşımıza iki farklı türde çıkmaktadır:

*Fiziki Bağımlılık, uyarıcı madde vücuda alınmadığı takdirde fiziki reaksiyon gösterilen durumlardır. Akabinde psikolojik bağımlılıkta baş göstermektedir.

*Psikolojik Bağımlılık, zihnin sürekli olarak uyarıcı maddeyi vücuda alınması yönünde sinyaller göndermesi ve sonucunda bireyin sürekli arayış içerisinde olduğu bağımlılıktır.

2.1.1. Bağımlılık yapan maddeler: uyuşturucu maddeler

Madde bağımlılığı evrensel bir sorun olmakla birlikte ülkemizde de başta genç nüfus olmak üzere bütün yaş kesimini tehdit eden önemli sorunların başında gelmektedir[12].

Kişinin merkezi sinir sistemi üzerinde etkili olan bu uyarıcı maddeler, bireyin otonom kontrol mekanizmasını tetikleyerek fiziksel fonksiyonların kontrolünü zorlaştırmaktadır. Ayrıca bireyde algı seviyesini düşürerek zihinsel işlevlerin yerine getirilmesini geciktirmektedir[6]. Alkol, sigara ve kafein uyuşturucu maddeler otonom kontrolü devre dışı bırakacak maddeler olmasalar da bireylerde gittikçe kullanımın artırılması isteğini tetiklerler. Özellikle kafein halk arasında sadece kahvede bulunduğu algısı yanlıştır. Kafein; çay, kahve, kola, asitli kola içecekler ve kakaolu tatlıların içerisinde de bulunmaktadır. Zamanla vücudun kullanıma adapte olması ve alınan dozların giderek artırılması madde bağımlılığının olduğunu göstermektedir.

Uyarıcı maddeler kullanım alanına göre iki ana gruba ayırmak mümkündür. Çünkü aynı kimyasal özelliklere sahip maddeler tıp alanında da hastanın uyuşturulması ve/veya tedavisi için kullanılmaktadır. Tıp alanında kullanılan uyuşturucu özelliğe sahip maddelere “ilaç” adı verilirken; kişinin otonom kontrolünü bozan ve tıbbi amaçla kullanılmayanlarına “madde” adı verilmektedir[13]. Vücuda alınan her madde hücreler tarafından algılanır ve bir kimlik oluşturulur. Hücresel öğrenme olarak adlandırılan bu süreç her birey için geçerlidir[5].

Uyuşturucu madde kavramı Yunancadan dilimize geçmiş, bireyde bağımlılık yapan, kolay kolay bırakılmayan maddelere verilen genel isim olmuştur[13]. Uyuşturucu maddeleri sınıflarına ayıracak olursak (Tablo 1);

Tablo 2.1 Uyuşturucu maddelerin sınıflandırılması

UYUŞTURUCU MADDELER		
1	Merkezi Sinir Sistemini Yavaşlatan Deprasanlar	*Afyon Türevleri **Afyon **Morfin **Eroin **Kodein
2	Uyarıcılar(Stimulanlar)	*Kokain ve Türevleri **Kokain **Crack

		Amfetaminler(Sentetik Eczalar) *Captagon ***Extacy *Kafein
3	Hayal Gösterenler(Halusinojenler)	*LSD **Meskalin **Psilosibin **DMT(Diemthyltriptamine) **STP(Serenity Tranquillity Peace)
4	Hint Keneviri	*Hint Keneviri *Esrar *Likit Esrar
5	Buharlaşabilen Kimyasal Maddeler (Solventler)	Organik Çözücüler/ İçi çekinilenler

2.1.1.1. Merkezi sinir sistemini yavaşlatan depresanlar:

Afyon, ağrı kesici olarak kullanımıyla tarihte bilinen en eski uyuşturucu maddedir. Haşaş bitkisinin özsuyundan elde edilir. Deri altına uygulanarak veya teneffüs ve sindirim yolu ile vücuda alınır.

Morfin, afyon bitkisinden elde edilir. Baz Morfin olarak da adlandırılmaktadır. Tıpta ağrı kesici olarak kullanılmaktadır.

Eroin, baz morfinin kimyasal işlemlere maruz kalması sonucunda elde edilen uyuşturucu maddedir.

Kodein, afyondan elde edilir. Tıpta öksürük giderici ve ağrı kesici olarak kullanılmaktadır.

2.1.1.2. Uyarıcılar(Stimulanlar)

Kokain, koka bitkisinden elde edilmektedir. Uyarıcı ve açlık duygusunu azaltıcı özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir. Morfinmanların tedavisi için kullanılmış ancak bağımlılık derecesi yüksek olduğu için yasaklanmıştır[6][14].

Crack, kokainin türevidir. En tehlikeli uyuşturucu maddedir.

Amfetaminler(Sentetik Eczalar), tıpta uyku bozukluklarının giderilmesinde, şişmanlık ve sinir hastalıklarının tedavilerinde ilaç olarak kullanılmaktadır.

Kafein, ilk kullanımda bağımlılık yapmamakla birlikte sürekli kullanıma bağlı olarak alışkanlık haline gelen maddelerdir. Beyinde yer alan adenozin reseptörünü uyararak vücutta alışkanlık haline gelmeyi sağlar. İlk etkiyi elde etmek için her kullanımda daha fazla kafein almak gerekmektedir. Madde tüketimi bırakıldıktan bir süre sonra vücutta oluşan adenozin reseptörlerinin azaldığı gözlemlenmektedir[78]. Kafein 3 alkil grubu olan bir tersiyer amin grubu ve azot atomuna bir karboksil grubunun bağlı olduğu bir amid grubu içermektedir[79]. Bu gruplara ek olarak imin karboksil, metil ve alken gruplarını da yapısında bulundurmaktadır. Kafeinin kimyasal formülü ; $C_8H_{10}N_4O_2$

2.1.1.3. Hayal Gösterenler halusinojenler

LSD, Kişinin hayal dünyasına dalmasını sağlayan ilaçlardır. Kişi gördüğü olayların birer hayal ürünü olduğunu bilir ve bunun ilaçtan kaynaklandığının farkındadır. Meskalin, Psilosibin, DMT(Diemthyltriptamine) ve STP(Serenity Tranquillity Peace) bilinen en yaygın halusinojenlerdir[6][14].

2.1.1.4. Kenevir

Esrar ve Likit Esrar Hint keneviri bitkisinden elde edilen uyarıcı maddelerdir.

2.1.1.5. Buharlaşılabilen kimyasal maddeler (Solventler)

Hava yolu ile hızlıca buharlaşabilen maddelerdir. Kırtasiye ürünlerinde, petrol ürünlerinde, temizlik ürünlerinde çeşitli kokular oluşturması amacıyla kullanılır [14].

2.1.2. Uyuşturucu madde analiz yaklaşımları

Dünya üzerinde yaklaşık olarak 45 milyon üzerinde psiko-aktif madde kullanıcısı mevcuttur. Bu kullanıcıların %15-20'si başka kendileri olmak üzere çevreye zarar vermektedir.

Zehir bilimi olarak adlandırılan toksikoloji kavramı, kimyasalların canlı yapısına etkilerini inceleyen bir bilim dalıdır[15]. Halk arasında “zehir” olarak adlandırılan uyuşturucu maddeleri genel olarak 3 ana başlıkta indirgemek mümkündür (Şekil 2.2);

2.1.2.1. Klinik toksikoloji/ tıbbi;

Farmasötik ajanların canlı vücudunda meydana getirdiği akut ve kronik enfeksiyonların izlenmesi, değerlendirilmesi, tanı ve tedavisini konu alan bilimdir. Bu bilim sayesinde canlı vücudunda meydana gelen hücresel değişimler araştırılmaktadır[16]. Tıbbi amaçlı yapılan bu analiz yöntemi, “Erken Teşhis Hayat Kurtarır” sloganıyla ilerlemektedir. Tedavinin başarılı olması iki temel unsura bağlıdır;

*Kişinin özgür iradesiyle tedavi olmayı istemesi

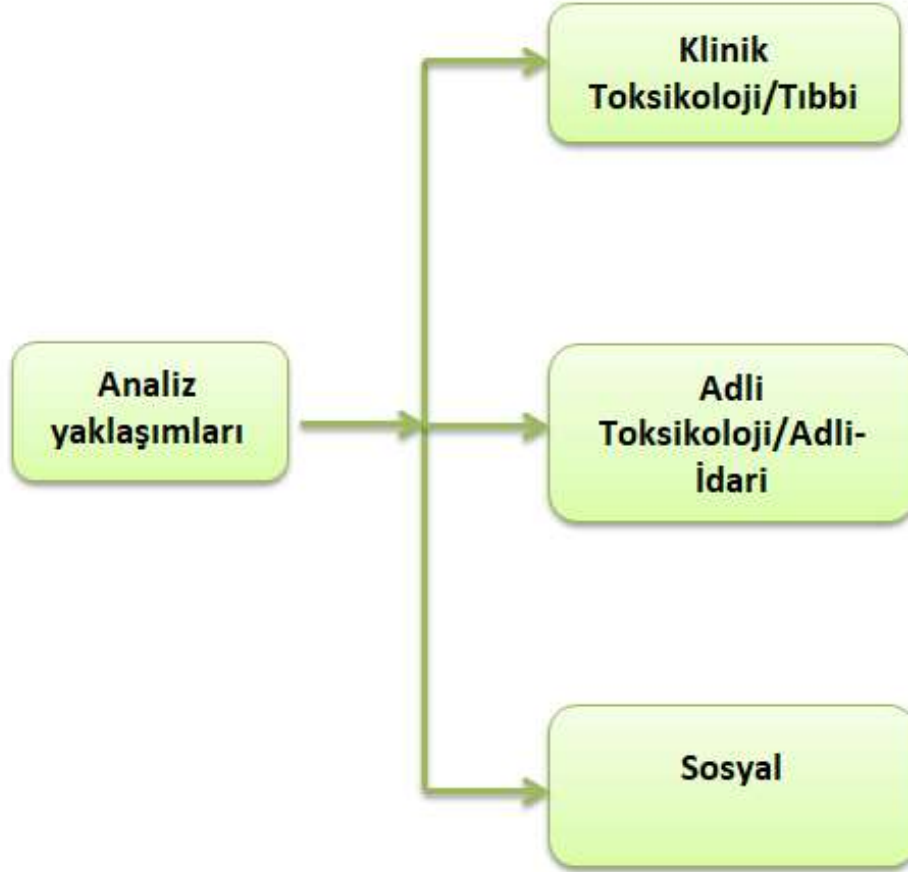
*Kişinin bağımlılıktan kurtulma konusunda kendini hazır hissetmesi

2.1.2.2. Adli toksikoloji/ Adli-idari;

Toksikolojinin, adli amaçlarda uygulanmasıdır. Kimyasalların, ilaçların ve uyuşturucu/uyarıcı maddelerin canlı vücudundaki zararlı etkilerin araştırılması bu bilim dalının konusudur[15]. Genel bir kural olmamakla birlikte tüm toksikoloji olayları adli toksikoloji ile ilişkilendirilmelidir. Örneğin, kimyasal fabrika işçilerinin ortamda yayılan farmasötik ajanlardan etkilenmesi sonucunda yetkililerin fabrikada gerekli yaptırımları yapması veya uyuşturucu madde etkisinde bir bireyin başka bireylere zarar vermesi...

2.1.2.3. Sosyal;

Canlının sosyokültürel hayatını olumsuz etkileyecek bağımlılık yapma özelliği olan maddelerin araştırılmasını ve bu etkilerden bireyi en az zararla kurtarmayı hedef almaktadır[17]-[18]. Örneğin ergenlik çağındaki çocukların bağımlılıktan kurtulmaları için tedaviye yönlendirmek ...



Şekil 2-1 Analiz Yaklaşımları

2.1.3. Uyuşturucu madde analiz yöntemleri

Bireyin uyuşturucu madde kullanıp kullanmadığı anlamayı üç ayrı başlıkta özetleyebilmekteyiz (Tablo 2.2).

Şüphe duyulduğunda, suç işlendiğinde ve/veya tedavi yolunun belirlenmesi amacıyla madde kullanıcılarına kalitatif ve kantitatif testler uygulanmaktadır. Bu testler genel olarak tarama testleri ve doğrulama testleri olarak adlandırılmaktadır.

Tablo 2.2 Bağımlılık Belirtileri[19]



*Hızlı kilo verme *Kusma, *İştahsızlık *Gözbebeklerinin büyümesi ve gözaltı torbalarının morarması, *Sinirlilik hali, *Bilincin tam olarak yerinde olmaması, *Yorgunluk, *Uzuvlarda istem dışı titremeler	*Bulunulan ortamda sürekli sorun yaşanması, *Dikkat dağınıklığı, *Hırsızlığa yatkınlık, *İçe kapanıklık, *Performans da düşüş, *Kavgacı ruh hali,	*Kişinin otokontrolünde ve algı gücünde azalma, * Hiperaktiflik veya pasiflik durumunun beklenmedik zamanlarda baş göstermesi, *Odaklanma sorunu, * Herkese karşı gelme, *İçe kapanıklık, *Halüsinasyon görme, *Ani korkular yaşama, *İstemsiz gülme
--	--	---

2.1.3.1. Tarama testleri

Tarama testleri immünokimyasal yöntemler ile yapılmaktadır. Uzunca bir süre tarama testlerinde gaz kromatografisi ve radyoimmunoassay yöntemleri kullanılmaktaydı. Ancak teknolojinin gelişmesiyle tarama testleri genel olarak 3 ayrı birimde kullanılmak üzere tasarlanmış oldu..

- Hasta başı testler, hastanelerde hastalara acil ve hızlı müdahalenin yapıldığı birimlerde kullanılmaktadır[20]. Alınan sonuçların tatmin etmemesi, treshhold

değerinin değişkenlik göstermesi sebebiyle Adli Toksikoloji alanında kullanımı çok önerilmemektedir.

- Laboratuvar testleri, immunokimyasal yöntemlere dayanan laboratuvar testleri; RIA(Radioimmunoassay), ELISA(enzyme-linked sorbent immunoassay), EMIT(Enzyme Multiplied IA), PFIA (Fluorescent Polarization IA), KIMS(Kinetic Interaction of Microparticles in Solution), CEDIS (cloned enzyme donor immunoassay)[16]. Genel olarak laboratuvar testleri daha az numune ile daha hızlı sonuçlar almaya olanak sağlasa da çapraz eşleşmeye olanak verdiği için sonuçların özgüllük değerini düşürmektedir[17][21].
- Laboratuvar testleri, kromatografik laboratuvar testleridir. Kantitatif sonuçların alınmasını sağlar. Örneğin, Gaz kromatografisi-Kütle kromatografisi(GC-MS), Sıvı Kromatografisi – Ardışık Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS)[17][22].

2.1.1.1. Doğrulama testleri

Doğrulama testleri biraz daha fizikokimyasal testlerdir. Kromatografi ve kütle spektroskopi cihazlarının birlikte kullanılması ile sonuçlar alınmaktadır. Alınan sonuçlar kantitatif özellikte olduğu için adli toksoloji alanında yaygın olarak kullanılmaktadır[17],[22].

Tüm bu çalışmalarda canlı vücudundaki ilaç ve toksin miktarının takibini kan ve idrar sıvıları ile yapılabilmektedir. Günümüzde çok fazla yaygınlığa kavuşmasa da saç,ter ve tükürük ile de analizler yapmak mümkündür. Ancak zaman ve maliyet bakımından ikinci planda yer alan yöntemlerdir[16].

2.2. Biyosensörler

Sensörler, farklı moleküller, ya da ortam şartlarını algılamaya yarayan ölçüm cihazlarıdır. Genel yapıları incelendiğinde bir algılayıcı, bir dönüştürücü ve kullanıcı ara yüzeyinden oluşmaktadır. Farklı kullanım alanlarına göre farklı sensörler mevcuttur. Bunlar: Mekanik sensörler, elektriksel sensörler, termal sensörler, manyetik sensörler, ışımaya sensörler, kimyasal sensörler, biyosensörler ve optik sensörlerdir. Yakın zamanda yapılan çalışmaların birçoğu biyolojik olarak önemli molekülleri algılamaya yönelik geliştirilen biyosensör çalışmalarıdır. Genel olarak tanımını yapacak olursak biyosensörler,

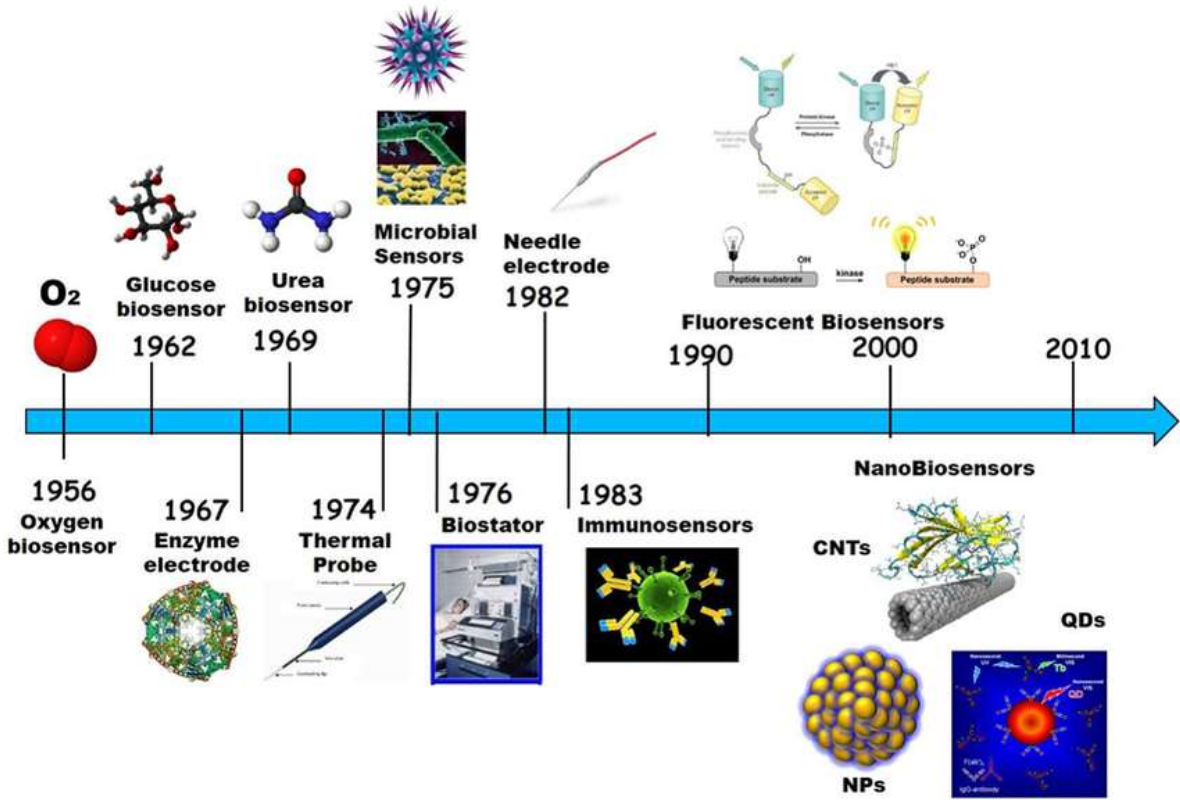
biyolojik, kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonları algılayıp anlamlı sinyallere dönüştürebilen cihazlardır[23],[24].

2.2.1. Geçmişten günümüze biyosensörler

Tarihte ilk biyosensör çalışması 1950’li yıllarda biyosensörün doğayeni olarak tanımlana C.Clark tarafından bulundu. Kandaki oksijeni bir elektrod vasıtasıyla takip etmeyi başaran Clark oksijen biyosensörünün temelini atmıştır. 1962 yılında ise Champs Lyons’la yaptıkları çalışmaların sonucunda kandaki glukoz miktarını ölçebilen biyosensör tasarladılar[26]. Tüm bu çalışmaların gündem olduğu bu süreçte bir diğer başarıda Gulibault ve Montalvo’dan geldi. Yaptıkları çalışmada diyaliz membranının arkasındaki yer alan potansiyometrik üre elektrodunu buldular[27].

Tablo 2.3 1970-1995 Biyosensör Tarihi

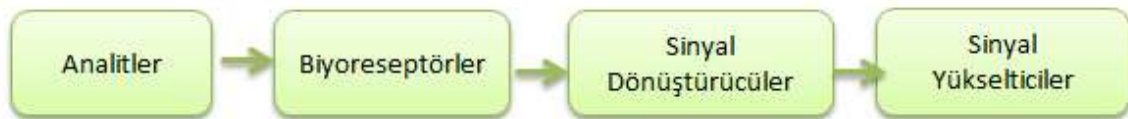
Tarih	Bulan Kişi	İcat
1970	Bergveld	ISFET(İyon algılayan transistör)’ün keşfi [28],[35].
1975	Lubbers ve Opitz	Karbondiyoksit ve oksijen tespiti yapabilen fiber optik biyosensör[29],[35].
1975	YSI	İlk ticari biyosensör (Glukoz sensörü)[30] ,[35].
1975	Suzuki	İlk mikrobe tabanlı immünosensör[31],[35].
1982	Schultz	Glikoz tespiti yapan fiber optik biyosensör[32] ,[35].
1983	Liedberg	Yüzey Plazmon Rezonansı(SPR)[33] ,[35].
1984	-----	Amperometrik biyosensör[34] ,[35].
1990	Pharmacia Biacore	Yüzey Plazmon Rezonansı tabanlı biyosensör[29] ,[35].
1992	i-STAT	El kan biyosensörü[29].



Şekil 2-2 Geçmişten günümüze biyosensörler [25].

2.2.2. Biyosensör tasarımı

Biyosensörler genel olarak 4 ayrı bölümden oluşmaktadır;



Şekil 2-3 Biyosensör Yapısı

Biyosensörlerin, genel tanımını yaparken de bahsettiğimiz gibi biyokimyasal değişimleri algılayarak ilgili/anlamalı elektriksel sinyallere dönüşümünü sağlayan mekanizmalardır. Şekil 2.3' de gösterimi yapılan mekanizmada Biyoreseptörler ve Sinyal Dönüştürücülerin oluşturduğu ikili grup başlı başına biyosensör olarak adlandırılabilirler[36].

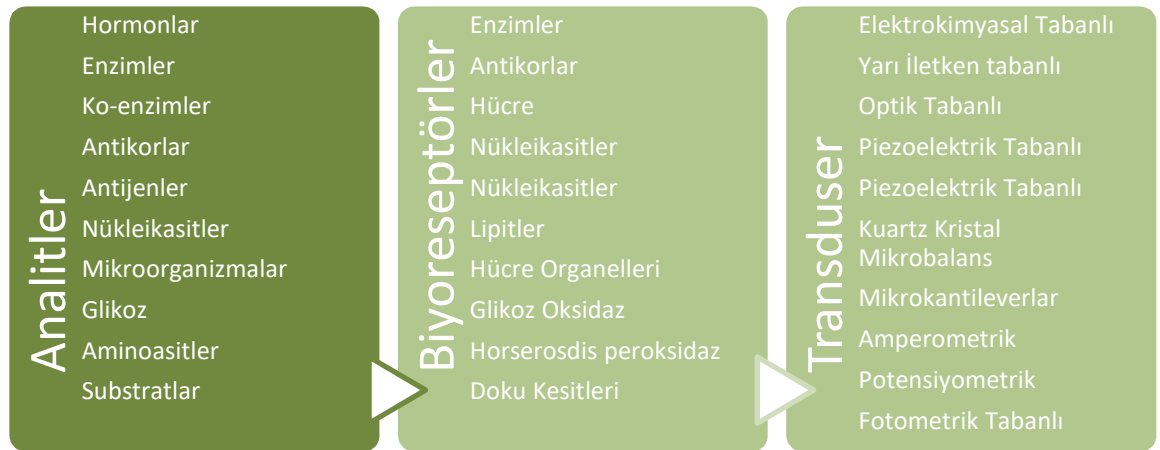
Analitler üzerinde ölçüm yapılabilen örnek numunelerdir. Genel olarak kullanılan analitler Tablo 2.4 gösterilmiştir.

Reseptörler, hücre dışındaki bir verinin/sinyalin tanımlayarak hücre içerisine alınmasını sağlayan yapılardır[37]. İlgili reseptörler biyolojik molekül içeren bir formda olduklarında biyoreseptör olarak adlandırılmaktadırlar[36]. Biyosensör içerisinde analitle ilk etkileşime giren bölümdür. Bir güvenlik duvarı gibi de düşünülenilir. Çünkü analit ile bir anahtar-kilit ilişkisine sahiptir. Analiz edilecek numune biyoreseptörün ilgili biyolojik molekülüne bağlanarak sisteme dahil edilir. Bu bağlanma analit içerisindeki proteinlerin biyoreseptöre bağlanmasıdır. Duyarlılığı ve seçiciliği oldukça yüksek olan mekanizmalardır.

Transduserler, biyoreseptörlerden gelen verileri ölçüp anlamlı elektriksel sinyallere dönüştürebilen mekanizmalardır. Biyosensörlerin çalışma sıralaması içerisinde üçüncü aşamada yer alan yapılardır. Analitin, biyoreseptör tarafından algılanmasının akabinde ilgili transduser tarafından oluşan veriler ölçülür. Tek çeşit transduser olmamakla birlikte tepkimeye uygun transduser seçimi önemlidir[36]. Biyosensörlerde kullanılan transduser çeşitleri Tablo 2.5’de listelenmiştir[38].

Sinyal Yükselticiler, transduserden gelen düşük sinyallerin anlamlandırılabilir seviyelere kadar yükseltilmesini sağlayan devre elemanlarıdır.

Tablo 2.4 Biyosensör Bileşenleri [36],[39].



İdeal biyosensörlerde olması gereken birtakım özellikler vardır;

2.2.2.1. Örnek seçimi ve hazırlanması

Hedef çalışmanın maksimize sonuç verebilmesi için en önemli parametre doğru analitin seçilmesidir. Çalışma yapılacak örnek numune içerisinde ilgili analiti ayırmak için

laboratuvarlarda genel olarak filtrasyon, santrifüj ve manyetik ayırıştırma yöntemleri kullanılmaktadır.

2.2.2.2. Performans artırma parametreleri

Biyosensörlerin ölçüm performansını etkileyen parametreler vardır[40].

- Seçicilik; Hedef ölçümlerde biyosensörün sadece ölçümü yapılacak olan analite ilgi duyması beklenir. Bu da çalışmanın özgünlüğünün bir kanıtıdır[41]. Altın oran hesaplamasını baz alan özgüllük çalışması için aynı analitin farklı konsatrasyonları üzerinde çalışmalar yapılarak gözlemlenebilmektedir[36].
- Kullanım ömrü, kullanılan her üründe olduğu gibi biyosensörlerinde uzun ömürlü çalışma göstermesi beklenir. Biyosensörlerin kullanımını etkileyen en önemli sistemi transduserlerdir. Ürünlerin kalibrasyon periyotlarına özen gösterilerek kullanım ömürleri uzatılabilir.
- Kalibrasyon, çalışma sonuçlarının doğruluğunu kanıtlayan kalibrasyon çalışmaları ilgili sensör üreticilerinin önerdiği kullanım sıklığına göre yapılması gerekmektedir.
- Tekrar edilebilirlik, art arda yapılan ölçümlerde benzer sonuçların gözlemlenebilmesi ilkesidir. Deneysel çalışmalarda en çok dikkat edilen parametrelerin başında yer almaktadır.
- Kararlılık, çevre koşullarına karşı hassa olan bu mekanizmaların stabilitesinin yüksek olması beklenir.
- Duyarlılık, seçicilik parametresi ile paralel yorumlanabilen bir özelliktir. Çalışılacak analite ilgi duyması beklenir.
- Ölçüm Sınırı, çalışılacak analitin belirli miktar aralığında olması gerekmektedir. Üreticilerin LOD testi yapmaları beklenmektedir.
- Zamanlama, biyosensörlerin ölçüm sonuçlarını mümkün olabilecek en kısa sürede vermesi istenir. Bu sonuçların hızlı/yavaş olarak nitelendirebilmek için oluşan akım-zaman grafikleri incelenir[42].
- Fiyat, kullanıcıların malzeme seçiminde dikkat ettikleri en önemli maddelerden biriside biyosensörlerin fiyatıdır. Basit, kolay ve ucuz olan sensörler tercih sebebidir.

2.2.2.3. Çalışma ortamı

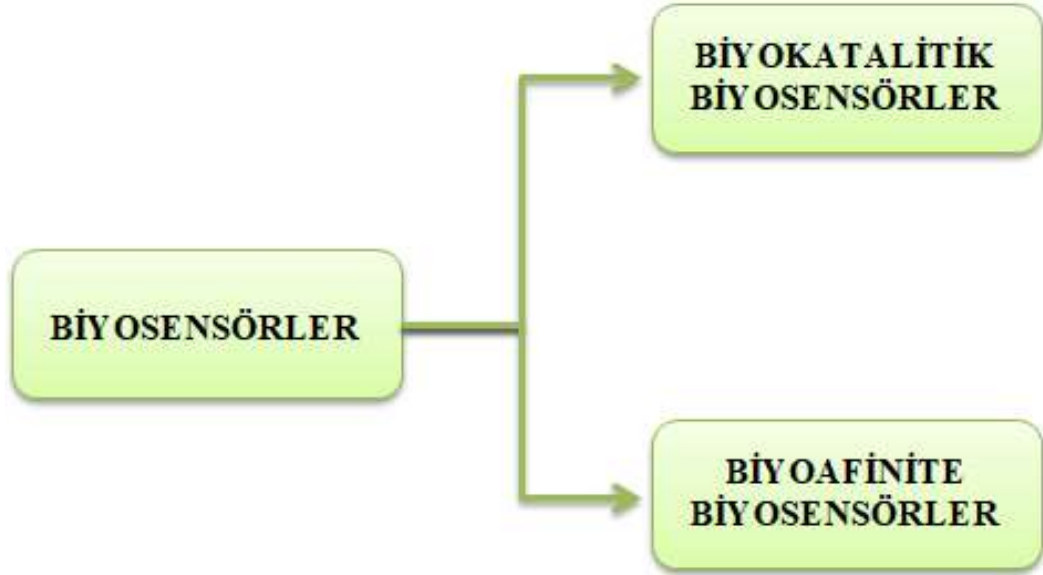
Teknolojinin gelişmesi ile birlikte biyosensör çalışmaları sadece laboratuvarlarda yapılmamaktadır. Saha da kullanıma imkan veren tasarımlarda mevcuttur. Ayrıca analiti otomatik olarak algılayabilen sensörlerin yanında yarı otomatik işlevselliğe sahip cihazlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Üzerine yerleştirilen ve/veya bağlantı kurulan analitten belirli periyotlarda ölçüm yapan ve bu ölçümleri kaydeden biyosensörlerde mevcuttur. Özetleyecek olursak çalışılacak konuya ve ortama uygun biyosensör mevcut teknoloji ile kullanıma hazırdır. Biyosensör uygulamalarında polimer kaplı membranlar tercih edilmektedir. Bunun sebebi ise polimerlerin kolay üretilebilir olması, esnek olması ve maliyetinin düşük olmasıdır.

2.2.3. **Biyosensör çeşitleri**

Biyosensör teknolojisi kendi içerisinde algılama mekanizması ve transduser mekanizmaları göz önüne alınarak sınıflandırılmaktadır[42].

2.2.3.1. Analizlenecek maddelere göre biyosensörler

Analizlenecek maddelere göre sınıflandıracak olursak (Şekil 2.4);



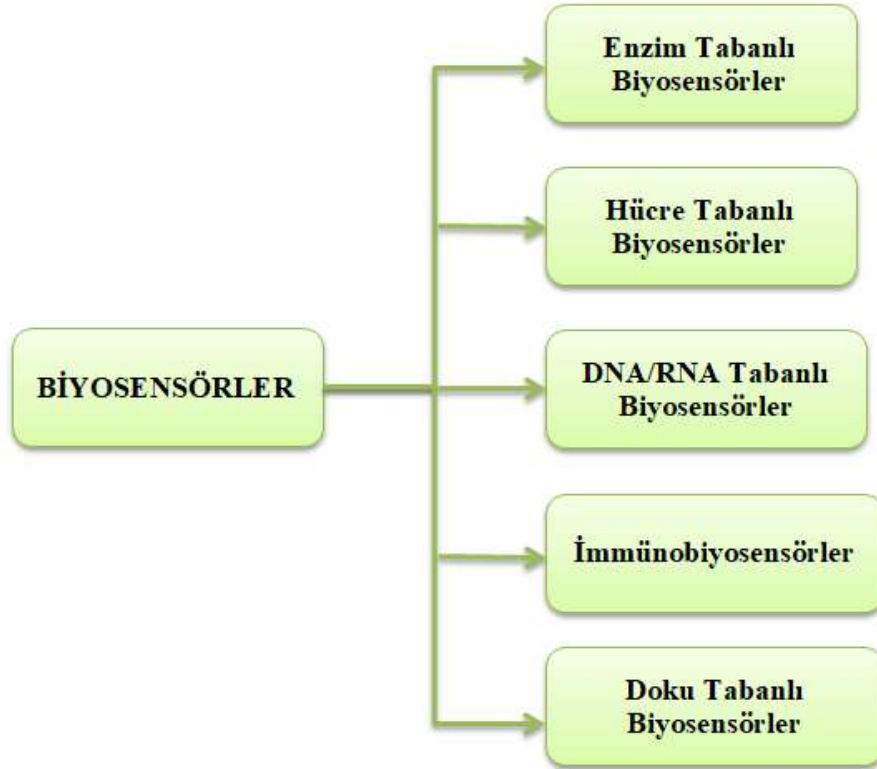
Şekil 2-4 Analizlenecek Maddelere göre Biyosensörler

Mikroorganizma, hücreler, dokular ve enzimlerin kullanıldığı biyosensörler biyokatalitik tabanlı sensör grubuna girmektedir.

Antijen-Antikor, nükleik asitler ve reseptör ilişkilerinin kullanıldığı biyosensörler biyoafinite tabanlı sensör grubuna girmektedir.

2.2.3.2. Biyoreaktif reseptörlere göre biyosensörler

Biyoaktif reseptörlere göre sınıflandıracak olursak(Şekil2.5);

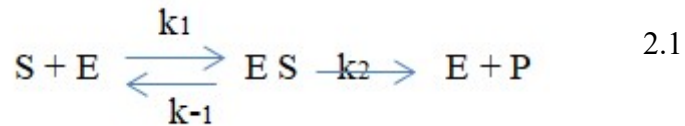


Şekil 2-5 Biyoaktif Reseptörler Göre Biyosensörler

➤ Enzim tabanlı biyosensörler

Biyosensör çalışmalarında en çok tercih edilen sensörlerdendir. Ortamdaki bulanıklık ve/veya gereksiz materyallerden kolay kolay etkilenmezler[43][44].

Enzimler, kimyasal reaksiyonları katalizleme yeteneğine sahip proteinlerdir. Enzimin katalizasyon Denklemi 2.1 'de gösterilmektedir[46].



S : Substrat

E : Enzim

ES: Enzim-Substrat Bileşiği

P : Ürün

K₁: Enzim-Substrat Bileşigi Meydana Gelme Oranı

K₋₁ : Enzim-Substrat Bileşigi Ayrışım Oranı

K₂: Enzim-Substrat Bileşiginin Diğer Ürünlere Ayrışım Oranı

Piyasada en çok kullanılan enzim tabanlı biyosensör, glukoz ölçümü yapan biyosensörlerdir.

➤ İmmüno-biyosensörler

Protein yapısı ile reaksiyonlarda yüksek özgünlük derecesi sağlayan antikorlar, antikor-antijen etkileşimini temel alan biyosensörlerdir.

İmmüno-biyosensörler, transduser tabanlı Biyosensörler içerisinde elektrokimyasal, optik ve termal biyosensör yapılarının içerisinde yer almaktadır[47].

➤ Hücre tabanlı biyosensörler

Hücre tabanlı biyosensörleri mikrobiyel tabanlı biyosensör olarakta sınıflandırabiliriz.

Mikrobiyal Biyosensörler, solunum transduseri ile bağlantı kuran canlı mikrobiyal hücrelerin varlığını ve metabolik değişimlerini izlemek için kullanılmaktadır. Tarihe ilk mikrobiyel biyosensör Davis [48] tarafından geliştirilmiştir.

➤ DNA/RNA tabanlı biyosensörler

Tüm nükleik asitler(DNA ve RNA) hücre çekirdeğinde yer almaktadır. DNA Biyosensörlerin de tanımlayıcı olarak DNA kullanılmaktadır. Bu tür sensörler tipik olarak elektrokimyasal, optik, ve piezoelektrik sinyal dönüştürücüleri ile çalıştırılmaktadır[47].

➤ Doku tabanlı biyosensörler

Geçmişten bugüne kadar bitki ve hayvansal kaynaklı doku materyalleri algılama parametresi olarak kullanılmaktadır. Tarihte ilk doku tabanlı biyosensör çalışmasını arginin tespiti için Rechnitz [49] yapmıştır.

Mitekondri, kloroplast,hücre duvarı gibi bazı organeller belirli analit çalışmalarında kullanılmaktadır.

2.2.3.3. Transduser mekanizmasına göre biyosensörler

Sinyal iletici olarak biyosensörleri beş ana başlıkta inceleyebiliriz (Şekil 2-6).



Şekil 2-6 Ölçüm Mekanizmasına göre Biyosensörler

➤ Elektrokimyasal tabanlı biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, analit konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleşen indirgenme-yükseltgeneme reaksiyonlarını içeren sistemlerdir [45]. Elektrokimyasal biyosensörler genel olarak çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrottan oluşmaktadır. Ölçüm şekillerine göre potansiyometrik biyosensörler, amperometrik biyosensörler, yarı iletken (kondüktometrik/ impedimetrik) biyosensörler olmak üzere 3'e ayrılmaktadır.

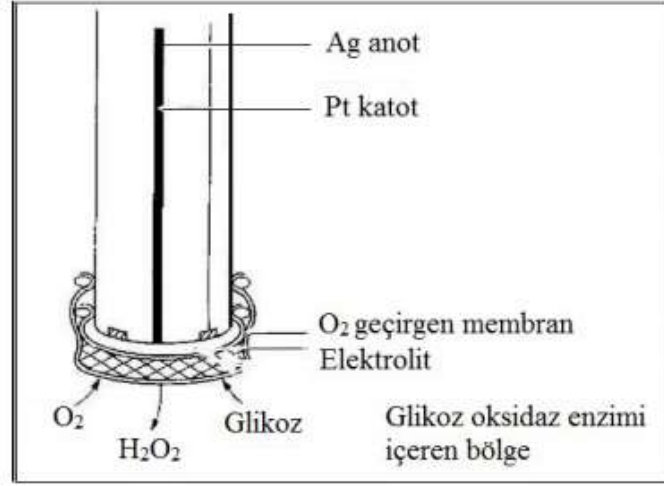
a. Potansiyometrik biyosensörler;

Potansiyometrik biyosensörler, bir referans elektrot ile bir çalışma elektrodu arasında ortaya çıkan potansiyel farkının ölçülmesine dayanan sistemlerdir. Elektrod(sensör) yüzeyinde oluşan yük birikimlerini gözlemlemek için kullanılmaktadır.

Çalışma elektrodu genelde F⁻, I⁻, CN⁻, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, H⁺, NH₄⁺, CO₂, NH₃ iyon ve gazlara seçicidir.

b. Amperometrik biyosensörler;

Amperometrik biyosensörler, uygulanan potansiyele karşı analit ile biyolojik tanı molekülü arasında gerçekleşen kimyasal reaksiyonların sonucunda ortaya çıkan akımı ölçer. En yaygın amperometrik biyosensörlerde Clark Oksijen elektrodudur[50].



Şekil 2-7 Clark oksijen elektrodu [45].

c. İmpedimetrik biyosensörler;

İmpedimetrik biyosensörler farklı varvasyonlardan sonra elektrot-çözelti ara yüzeyinde elektron aktarımına karşı olan direncin ölçülmesi işlemini gerçekleştiren sistemlerdir.

➤ Optik tabanlı biyosensörler

Optik biyosensörler analit ile biyoalgılayıcıdan gelen verileri yansıma, kırılma ve floresan gibi özelliklerine göre işleyen transduserlerdir. Kırılma indisini baz alan sensörler kaybolan alan hesabına göre sonuç vermektedir[44],[51].

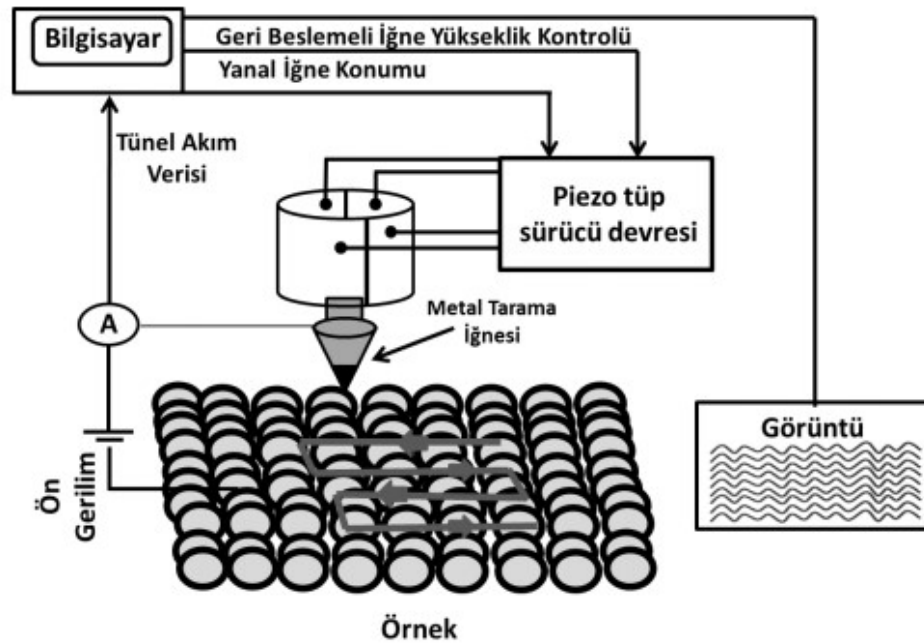
➤ Kalorimetrik Tabanlı Biyosensörler

Kalorimetrik tabanlı biyosensörler, enzimatik biyosensörlerdir. Kimyasal tepkimelerde enzim ile substratın bileşimi sonucu ortaya çıkan entalpinin ölçülmesi esasına dayanır. Reaksiyon sonucunda oluşan sıcaklık değişimleri ile substrat konsatrasyonu

arasındaki ilişkinin açıklanmasına yardımcı olur. Sıcaklık izlenmeleri termistör ve /veya termofiller ile sağlanmaktadır.

➤ Piezoelektrik tabanlı biyosensörler

Piezoelektrik esaslı Biyosensörler, piezoelektrik etkiyi baz alan çalışma prensibine sahip sensörlerdir. İçerisinde kuvars adı verilen materyaller bulunmaktadır. Bu materyallerin üzerlerinde yük yokken bile titreşim halindedirler. Antijen-antikorların kristal bir yüzeye tutunması ile kütle artışı meydana gelmektedir. Bu da titreşim gücünü azaltmaktadır. Kütle değişiminden kaynaklı oluşan titreşim farklılıklarını ölçen sensörlere piezoelektrik tabanlı biyosensör adı verilmektedir[35]. İmmunosensör uygulamalarında kullanılmaktadır. Biyosensörün çalışma prensibi Şekil 2.8’de gösterilmektedir[52].



Şekil 2-8 Piezoelektrik Tabanlı Biyosensör Şeması

➤ PGE (Kurşun Kalem Grafit Elektrotlar)

Kurşun kalem elektrotları(PGE), karbon katı elektrot grubunda yer almaktadır.Katı elektrotların en olumsuz özelliği her kullanımda yüzeylerinin temizlenmesi gereksinimidir. Karbon elektrotlar, tek kullanımlık, hızlı cevap üretebilme ve maliyetinin düşük olması gibi artı özellikleri vardır. Elektrokimyasal çalışmaların çoğunda karbon elektrod türleri kullanılmaktadır.

Katı elektrod kullanımının başladığı ilk zamanlarda analiz sonucunda elektrod yüzeyinde az da olsa bir film tabakası oluşuyordu. Bu tabakanın uygun yollarla

temizlenmesi sonucunda elektrotlardan ilk çalışmadaki gibi performansların alınamadığı gözlemlendi. Bunun sonucunda elektrot yüzeyinin temizlenmesinin tekrar edilebilirlik üzerinde olumsuz etki yarattığı fark edildi. Tek kullanımlık PGE çalışmaları 1990'lı yıllarda trend topik olmuştur[53].

PGE, çalışmalarında elektrot olarak kalem uçları tercih edilmektedir. Bu uçların yapısında yer alan grafit dışındaki kil ve balmumu yapıları onların ne çok sert ne de çok kırılabilir olmasını sağlamaktadır. İçerik oranları değiştirilerek ve ilave materyaller eklenerek kırılabilir ve/veya sert yapıda elektrotlar elde edilebilmektedir. PGE ile yapılacak analizlerde uygun sertlikte kalem uçları kullanımına özen gösterilmelidir[54],[55].

PGE'ler, katı elektrot gruplarına dahil olmalarına rağmen en önemli özellikleri tek kullanımlık olup yüzey temizlenmesine ihtiyaç duymamalarıdır. Ayrıca ucuz olmaları, hassas ölçüm yapabilmeleri ve piyasada kolay bulunabilme özellikleri tercih sebebidir. Bu özelliklerinden dolayı birçok elektrokimyasal reaksiyonlarda kullanılmaktadır[56],[57],[58].

Teknolojinin gelişmesi ile birlikte PGE, DNA ve RNA sensörü olarak kullanılmış ve mevcut kullanımdaki cam karbon elektrottan(GCE) daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir[54].

Kariuki, PGE ve GCE'nin çalışma prensipleri üzerine çalışmış ve PGE'nin daha hassas ölçümler verdiğini raporlamıştır[59].

a. Elektrotların modifiye edilmesi;

Her revizyonun bir sorun sonucunda doğduğu kuramından yola çıkarak farklı türlerde elektrot modifiyesinin mümkün olduğunu söyleyebiliriz. Yapılan çalışmalarda istenilen sonuçların alınamaması elektrot işlevselliğinde iyileştirme çalışmaları yapılması gereksinimini doğurmuştur.

Elektrot yüzeyinin kaplanması sonucunda olan elektrotlara modifiye elektrot adı verilmektedir[60].

Genel olarak iki farklı yol kullanılmaktadır. Kimyasal olarak yapılan modifiye işlemlerinde elektrotun performansını arttıracak yönde çalışmalar yapılırken, kompozit tabanlı modifiyelerde ana madde elektrot ile harmanlanır[53].

b. Breath figure yöntemi;

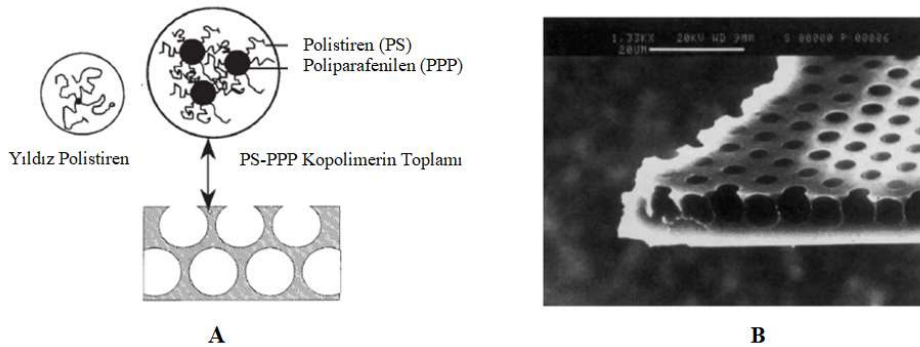
Breath Figure (BF) methodu, su buharının kendisinden daha soğuk bir yüzeye teması sonucu oluşan yoğunlaşmayı baz alan bir tekniktir. Yüzey üzerinde gerçekleşen

yoğunlaşma, su buharının doygunluk sıcaklığından daha düşük sıcaklıktaki bir yüzeyle- katı- temas ettiğinde gerçekleşir. Bu temas sonucunda yüzey üzerinde küçük damlacıklar meydana gelir. Bu damlacıklar difüzyon ile birleşerek daha büyük damlalar oluştururlar. Bu teknik gündelik hayatta birçok yer de karşımıza çıkmaktadır. Bu olgu bilimsel olarak ilk defa 1893'te [61] Aitken tarafından ve daha sonra 1911'de Rayleigh [61] tarafından yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Rayleigh'ın çalışmalarında temiz cam yüzeyi üzerinde su buharının yoğunlaşma ile damlalar oluşturduğu –ilk başta sabit olan damlalar- zamanla bu damlaların difüzyonla birleşerek düzensiz ama daha büyük su damlalarını oluşturduğu görülmüştür [62]. Daha sonra yapılan çalışmalarda su damlalarının belirli bir doygunluk seviyesine kadar birleşebildiği gözlenmiştir. Nefes Figürü (BF) alanında ilk deneysel çalışma 1994 yılında François ve arkadaşlarına aittir. François ve ark. Yapı birimleri olarak polistiren (PS) polimer veya PS / poliparafenilen (PPP) blok kopolimerini çözücü olarak organik karbon disülfür (CS₂) kullanıldı (bknz. Şekil 2-9). François, hegzagonal film oluşumu için üç önemli aşamadan bahsetmiştir[63];

1. Malzeme cinsi
2. Çözücü
3. Nem

Yapılan çalışmalarda daha fazla faktörün etkili olduğu ortaya çıktı.

Breath Figure methodu katı yüzey üzerine -nemli bir ortamda -sürülen polimer çözeltisi yüzeyinin kondensasyonu sonucu yüzeyde meydana gelen - nanometre ile mikro ölçek aralığında - gözenekli membranlardır. Bu Teknik mevcut kullanılan yöntemlere göre basit aparatlarla dizayn edilmiş olup hem daha ucuz hem daha kullanışlıdır.



Şekil 2-9 (A) Yıldız PS polimeri / PS-PPP blok kopolimerinin gözenekli -bal peteği-film oluşumunun şematik çizimi; (B) PS-PPP altıgen yapılı filmlerin SEM görüntüsü [64].

BF method, kütle/ısı geçişi aşamaları ile kendiliğinden gerçekleşen birleştirme işlemidir. Bu method, damlacıkların stabilitesi ile polimer ve çözücü arasındaki etkileşimlerde film oluşumunu büyük oranda etkiler. Uygulanan bu yöntemi termodinamik ve kinetik çalışma olarak tanımlamak doğru değildir[65]. Yapılan araştırmalara göre BF methodunun genel Kabul görmüş işlem basamakları [64]-[71];

1. Polimerin nemli ortamda katı yüzeye dökülmesi ve çözücünün zamanla buharlaşması sonucu polimer yüzeyinin daha soğuk hale gelmesi,

2. Su damlacıklarının yoğunlaşması,

3. Su damlacıklarının büyüyerek düzenli heterojen -altıgen yapıda- gözenek yapılarının oluşması,

4. Tüm çözücülerin ve suyun buharlaşması ile gözenekli film tabakasının oluşması olarak özetlenebilmektedir. Çözücünün tamamen buharlaşması sonucunda oluşan gözenekli filmler opaktır. Bağıl nemin istenilen seviyeden daha düşük olduğu durumlarda ise oluşan filmler gözeneksiz ve transparandır. BF methodunda filmlerin oluşumunu etkileyen çeşitli parametreler vardır.

Tablo 2.5 Değişen morfolojik özelliklere göre gözenek yapılarının boyutu [72].

PARAMETRELER	ETKİLERİ
Bağıl nemin artması	Gözenek boyutunun artmasına
Hava akış hızının artması	Gözenek boyutunun azalmasına
Polimer konsantrasyonunun artması	Gözenek boyutunun azalmasına
Polimerin moleküler ağırlığının artması	Gözenek boyutunun artmasına
Çözücü Uçuculuğunun artması	Gözenek Boyutunun azalmasına
Buharlaşma oranı artması	Gözenek boyutunun artmasına
Sıcaklığın artması	Gözenek Boyutunun azalmasına
Vakumun artması	Gözenek boyutunun artmasına

Uygun parametrelerde oluşturulduktan sonra Breath Figure method ile PGE üzerine yerleştirilen polimer çözeltisi çözücünün uçmasıyla elektrod üzerinde gözenekli polimerik film tabakası meydana getirir..

c. Kimyasal birikim yöntemi;

Kimyasal birikim methodu, sıvı içerisine elektrik akımı uygulanarak çözülmüş kimyasalların ayrıştırılması prensibine dayanan bir elektroliz yöntemidir.

Genel olarak elektroliz işlemlerinde bir kabın içerisinde birbirini ile temas etmeyen iki adet elektrot yer almaktadır. İlgili elektrodlar gün kaynağına bağlandıklarında üzerlerinde yük geçişi meydana gelir. Ampometrik biyosensör çalışmalarını kimyasal birikim yöntemine örnek verilebilmektedir.

2.2.3.4. Biyosensör uygulamaları

Biyosensörler, çok yönlü uygulama alanlarına sahiptir. Genel olarak özetleyecek olursak; tıp, eczacılık, gıda, tarım, savunma gibi sektörlerde önemli roller üstlenmektedir.

➤ Tıp ve eczacılık alanında[73];

Hastalığın teşhisi için ilgili biyomoleküllerin saptanması, metabolit ölçümleri, kalp pili çalışmaları, kandaki glukoz ölçümler, protez cihazlar...

➤ Çevre alanında[74];

Hastane koşullarının takibi, kirlilik izleme

➤ Savunma Alanında

Savunma alanında zararlı bileşenlerin tespiti, asgari uygulamalar

➤ Endüstriyer atıklar

➤ Proses Kontrolü

Fermantasyon işlemlerinin takibi gibi çalışmalar örnek verilebilmektedir.

2.1.1.1. Ticari biyosensörler

Geçmişten bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda ticari ürün haline dönüşen bir çok biyosensör vardır. Tarihteki ilk ticari biyosensör 1975 yılında YSI tarafından glukoz ölçümü için kullanılan biyosensörlerdir[30],[35].

Özellik tıp alanında yaygın kullanıma sahip bu sensörlere gebelik testleri, hepatit testleri, HIV testi, Doğurma potansiyeli ölçme testleri, şeker testi...

Asgari alanda geliştirilen Biyosensörler toksit madde analizini 2 dakikadan kısa sürede yapabilmektedir.

3. MATERYAL VE METHOD

3.1. Kimyasallar ve Kullanılan Cihazlar

Elektrodun modifiye edilmesinde kullanılan kimyasallar;

Bakır(II) sülfat pentahidrat (Merck), sodyum hidroksit (Sigma Aldrich), kalsiyum klorür (Merck), diamonyum-fosfat(Merck), poliüretan(Wbrizol), kloroform (Meb-ders Aletleri Yapım Merkezi) şeklindedir.

Analiz yapılan çözeltiler için sodyum fosfat tamponu çözeltileri NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , H_3PO_4 , HCl ve deiyonize su kullanılarak pH 7,4 göre ayarlanmıştır. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ve $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ kimyasalları kullanılmıştır.

Voltametrik ölçümler için Palm Sense 4 markalı potansiyostat/ galvonostat cihazı kullanıldı.

PH ölçümleri için Milwaukee markalı Mi 180 Bench meter modele sahip pH cihazı kullanıldı. PH ölçümlerinden önce 4-7-10 tamponları ile kalibre edildi.

Tartım işlemleri Weightlab Instruments markalı WL 303L modeli analitik terazi kullanıldı.

Çözelti hazırlama işlemleri için Merck markalı Direct-Q modelinden alınan 18,2 MΩ dirence sahip ultra saf su kullanıldı.

Sem analizleri için Carl Zeiss markalı elektrot mikroskobu kullanıldı.

3.2. Elektrodların Modifikasyonu

3.2.1. Kalem ucu grafit elektrodların hazırlanması

Tezimizde kullanılan kalem ucu elektrot(PGE) Tombow (0.5 mm, 2B) markalı kalem uçlarının 3.2 cm'i dışarıda olacak şekilde ayarlandı. 0.05 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 M NaOH çözeltisi 1:5 oranında ve 0.5 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 M NaOH çözeltisi 1:3 oranında çözelti hazırlandı.

Hazırlanan bu çözeltilerde kalem uçlarımız (PGE) çözeltileri içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra 24 saat kapalı ortamda kurumaya bırakıldı(Yüzey absorpsiyonu için).

Analit çözeltisi için 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi hazırlandı. Modifiye ettiğimiz kalem ucu elektrotlarımızın 1 cm hazırlanan çözeltilere daldırıldı.

24 saat sonunda CV ölçümlerimiz için potansiyostattaki ölçüm parametreleri -0.5 V ile +0.8 V arasında 1 V/s tarama hızında döngüsel voltammogramlar alındı.

3.2.1.1. Nefes figürü ile elektrotların kaplanması

Nefes figürü ile gözenekli film üretme yöntemi kullanılmıştır. Film sentezine başlamadan hemen önce belirlenen ağırlıkça %1'lik, %2,5 'lik ve %5'lik derişimlerde PU ve Kloroform çözeltisi hazırlanmıştır.

Nefes figürü için kapalı bir ortam sağlandı. Kapalı sistem içerisindeki nem oranı %75, sıcaklık ise oda sıcaklığında sabit tutularak sıcaklık/nem ölçer ile takibi sağlandı.

Kapalı sistemde kalem ucu elektrotlarımız PU ve kloroform çözeltisi içerisine daldırıldı. 5 dakika boyunca bekletildi. Uygulama süresince sistem kapalı kaldı. Bu işlemde gözenek oluşturulması hedeflendi.

Aynı yöntemle PU ve Kloroform çözeltisine daldırdığımız kalem ucu elektrotlarımızı 0.05 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 M NaOH çözeltisi 1:5 oranında hazırladığımız çözeltilere daldırdık. Hedeflenen gözeneklere bakır (II) sülfat pentahidrat ve sodyum hidroksit birikmesi gerçekleştirildi. İstenilen düzeyde gözenek oluşması ve çözeltilerin gözeneklere birikmesi sağlanamadı.

3.2.1.2. Hidroksiapatit ile kalem ucu elektrotların hazırlanması

CaP, en önemli özelliklerinden birisi iyon değişimi özelliklerine sahip olmalarıdır. Yüzey alanını artırma etkisi sayesinde elektrokimyasal analizlerde iletkenliğin artışı gözlemlenmektedir. İyon değişimleri CaP kristal yüzeyindeki gevşek bağ yapısı ile sağlanmaktadır.

Bakır iyonlarımız kalsiyum fosfat içerisine absorbe olmaktadır.

Tezimizde araştırdığımız literatür bilgilerimize dayanarak HAP kullanarak kalem ucu elektrotlarımızın yüzey alanını arttırdık. Sonrasında bakır iyonlarımızı yüzey içerisine absorbe ettik. 0.12 M CaCl_2 ve 0.06 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ kullanarak HAP elde ettik. Kalem ucu elektrotlarımızı 5 dakika süreyle CaCl_2 ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ daldırdık. Bu şekilde elektrodumuzun yüzey alanını arttırmış olduk.

Bakır iyonumuzu oluşturmak için 0.05 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.3 m NaOH 1:3 ve 1:5 oranlarında hazırlandı.

Hedeflediğimiz bakır iyonunu elektrotlarımızdaki HAP yüzeyine absorpsiyonunu gerçekleştirmiş olduk.

3.3. Elektrokimyasal Çalışmalar

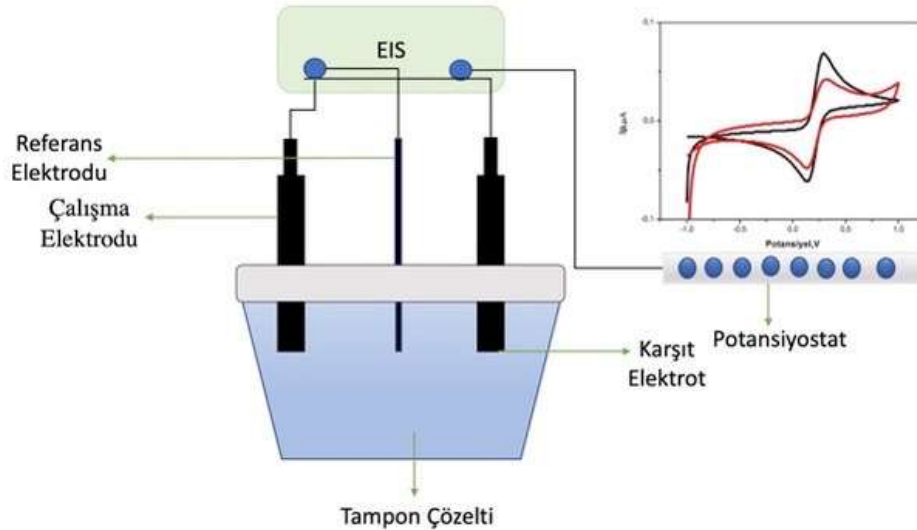
Elektrokimyasal çalışmalarda Tombow marka 0.5 mm çapında 2B kalem uçları elektrot olarak kullanıldı. Kalem uçlarının 1 cm'lik uç kısımları hazırlanan çözeltilere

daldırılıp istenilen sürelerde bekletilerek çözeltilerin elektrot yüzeyine absorpsiyonu sağlandı. Ardından oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Hazırladığımız kalem uçları çalışma elektrodu oldu.

3.3.1. Elektrokimyasal hücre

Elektrokimyasal analizör 3'lü elektrot sistemine sahip elektrokimyasal hücre içermektedir.

Elektrokimyasal hücre üçlü elektrot sistemi olarak adlandırılırken, çalışma elektrodu(PGE), platin karşıt elektrot ve Ag/AgCl referans elektrodundan oluşmaktadır. Düzenekte bağlantılı kablolardan üçü elektrotlara bağlı ikin birisi topraklama için ayrılmıştır.



Şekil 3-1 Elektrokimyasal analizör

3.3.2. Çözeltilerin hazırlanması

5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltileri $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ve $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ kullanılarak hazırlandı. 0.2 M pH 7.4 sodyum fosfat tampon çözeltileri NaH_2PO_4 ve HCl kullanılarak deiyonize su ile hazırlandı.

Farklı derişimlerde bakır sülfat pentahidrat, sodyum hidroksitler hazırlandı. En iyi sonucun 0.05 M CuSO_4 0.1 M NaOH 1:5 oranında ve 0.5 M CuSO_4 + 0.5 M NaOH 1:3 oranında olduğu belirlendi.

HAP sisteminde 0.05 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:3 ve 1:5 oranında hazırlandı.

Kafein konsatrasyonu 50 uM 50 mL'lik balon joje içerisinde hazırlandı. 0.485 g kafein 50 mL ultra saf su içerisinde çözüldü. Stok çözeltileri hazırlanmış oldu.

3.3.3. Elektrokimyasal analiz

3 elektrotlu voltametrik sistemlerde çalışma elektrodu ve referans elektrodu arasında uygulanan ve zamanla değişen gerilime karşı iki elektrot arasındaki akım ölçülmektedir.

Tezimizde voltametrik ölçümler için elektrotlar sodyum fosfat tampon çözeltisine (pH 7.4) daldırılmıştır. Kafein konsantrasyonu 50 uM 50 mL'lik balon joje içerisinde hazırlandı. 0.485 g kafein 50 mL ultra saf su içerisinde çözüldü. Stok çözeltisi hazırlanmış oldu. CV ölçümleri -0.5 V ile +0.8 V arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.1. Elektrot davranışlarının incelenmesi

Çıplak elektrot ve modifiye etmiş olduğumuz elektrot davranışlarını incelemek için $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisine elektrotlarımızı daldırarak çözelti içerisinde dönüşümlü voltamogramları alınmıştır. Elektrottan ideal cevabın alınmasına kaplamada kullanılan çözeltilerin farklı derişimler de hazırlanması incelenmiştir. Bunun için dönüşümlü voltametri sonuçlarına bakılmıştır. Çalışmalarda en iyi sonucun alındığı parametreler kullanılmıştır.

3.3.3.2. Nitel analiz

Hazırlanan kalem ucu elektrotlarımızı kafein tayininde kullanıp kullanılmayacağına bakmak için pH 7.4 değerinde nitel analiz yöntemi denenmiştir. Modifiye ettiğimiz elektrotlar kafein çözeltisinde bekletilip, buradaki davranışları dönüşümlü voltametri yöntemi ile incelendi.

3.3.3.3. Nicel analiz

Hazırlanan kalem ucu elektrotları kafein tayini için nicel analiz metodu olan kare dalga voltametrisi ile yapılmıştır.

3.4. Elektrotların Karakterizasyonu

3.4.1. Morfolojik değerlendirmeleri

Hazırlanan kalem ucu elektrotların morfolojik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak yapılmıştır. SEM analizleri için hazırlanan kalem ucu

elektrotlar oda sıcaklığında tutulmuştur. Elde edilen SEM fotoğraflarından yola çıkarak, çözeltilerin elektrot uçlarındaki çap dağılımları incelenmiştir.

3.4.2. Elektrot yüzeylerinin kimyasal yapısının karakterizasyonu

ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared) spektroskopisi kimyasal yapıların analizi için kullanıldı. ATR tekniği, bir prizmadan sulu çözeltilere penetre olan sönümlü dalganın sulu çözeltideki maddeler tarafından emilmesi ve sulu çözelti ile prizmanın ara yüzünden yansıyan ışınların toplanması esasına dayanmaktadır. Bu metod transmisyon-FTIR spektroskopisindeki ışık yolu ve derişim gibi problemlere çözüm getirmektedir. Kalem ucu elektrotların kimyasal karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılmıştır. Hazırlanan elektrotlar cihazın örnek yuvasına koyulmuş ve ölçüm alınmıştır.

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

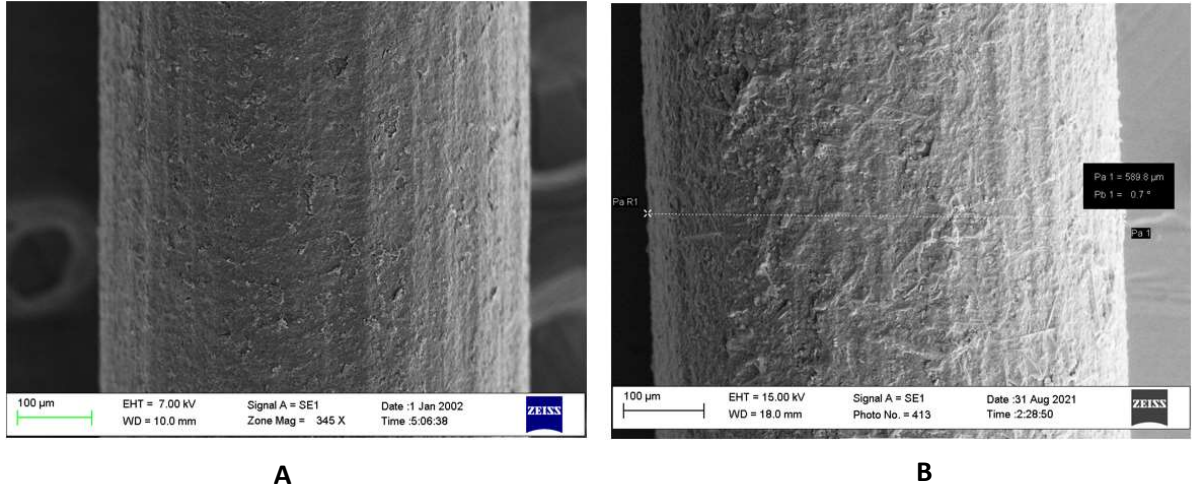
4.1. Elektrod Modifikasyonu ve Karakterizasyonu

Hazırlanan kalem ucu elektrotların morfolojik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak yapılmıştır. SEM analizleri için hazırlanan kalem ucu elektrotlar oda sıcaklığında tutulmuştur. Elde edilen SEM fotoğraflarından yola çıkarak, çözeltilerin derişim değışimleri incelenmiştir.

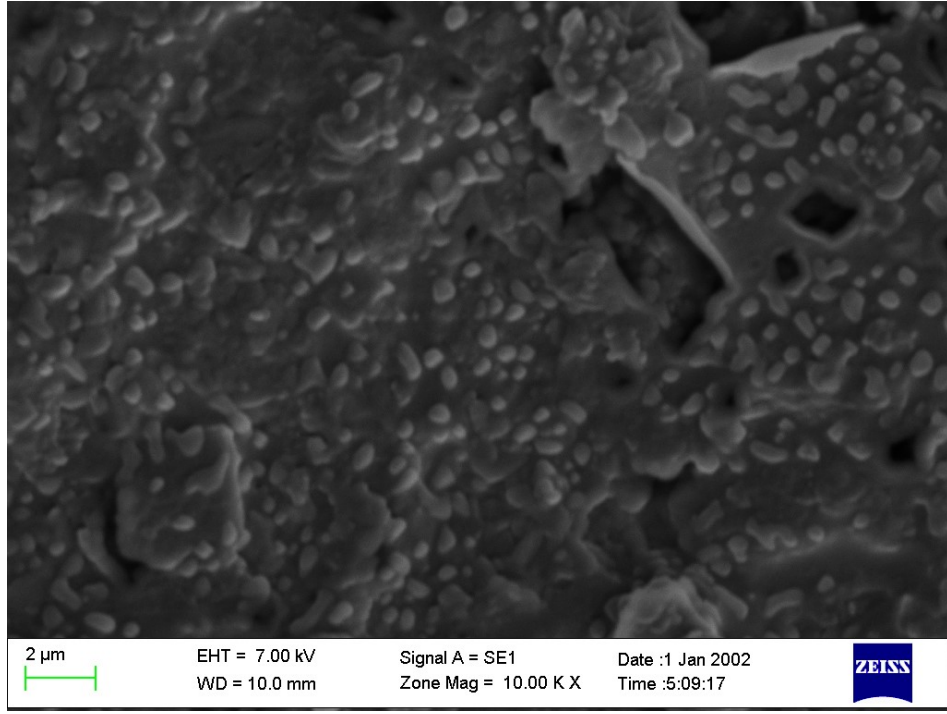
ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared) spektroskopisi kimyasal yapıların analizi için kullanıldı. ATR tekniği, bir prizmadan sulu çözeltiye penetre olan sönümlü dalganın sulu çözeltideki maddeler tarafından emilmesi ve sulu çözelti ile prizmanın ara yüzünden yansıyan ışınların toplanması esasına dayanmaktadır. Bu metod transmisyon-FTIR spektroskopisindeki ışık yolu ve derişim gibi problemlere çözüm getirmektedir. Kalem ucu elektrotların kimyasal karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılmıştır. Hazırlanan elektrotlar cihazın örnek yuvasına koyulmuş ve ölçüm alınmıştır.

4.1.1. Morfolojik inceleme

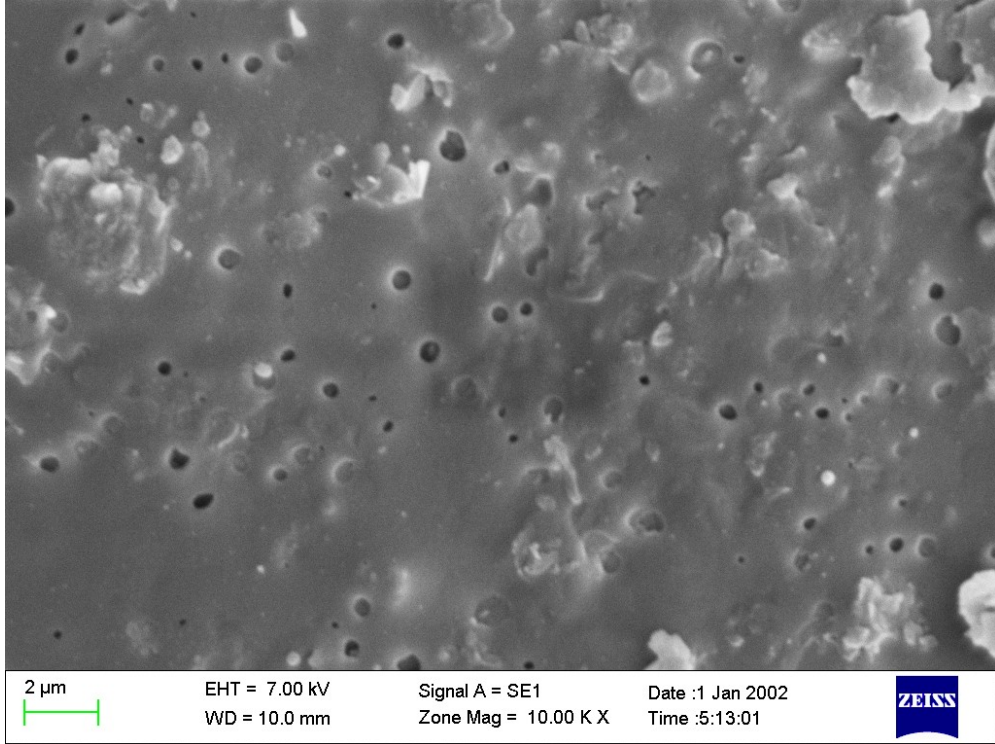
Hazırlanan elektrotların morfolojik incelemeleri SEM ve FT-IR ile yapılmıştır. Elektrotların karşılaştırmalı SEM ve FT-IR görüntüleri yüzeyin homojen olarak başarılı bir şekilde kaplandığını göstermiştir.



Şekil 4-1(A)Modifiye edilmemiş elektrod yüzeyi (B) Hidroksiapatit ile modifiye edilmiş elektrod yüzeyi



Şekil 4-2 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.1M NaOH 1:5 oranında

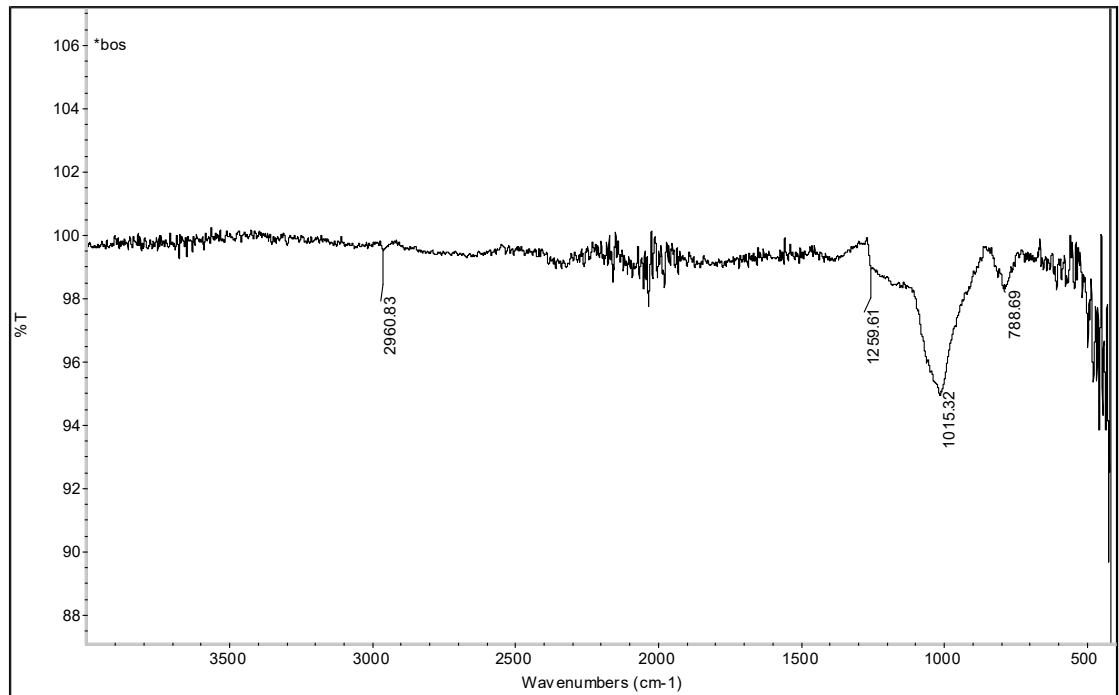


Şekil 4-3 PU+ 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.1M NaOH 1:3 oranında

4.1.2. FT-IR incelemeleri

Tez kapsamında farklı yöntem ve malzemelerin kullanılmasıyla hazırlanan/modifiye edilen Kalem Grafit Elektrodun (PGE) yüzeylerinde yapılan işlemler sonucu meydana gelen değişiklikler, bir başka deyimle elektrod yüzeylerinin kimyasal yapıları FTIR-ATR spektrometresi (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak incelenmiştir. Bu kapsamda modifiye edilmemiş elektrod, breath figüre yöntemi ile modifiye edilen elektrod ve hidroksiapatit (HAP) ile modifiye edilen elektrod numunelerinin yüzey özellikleri FTIR-ATR ile analiz edilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen FTIR spektrumlar aşağıda sunulmuş ve elde edilen karakteristik pikler literatürde yer alan benzer çalışmalar ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

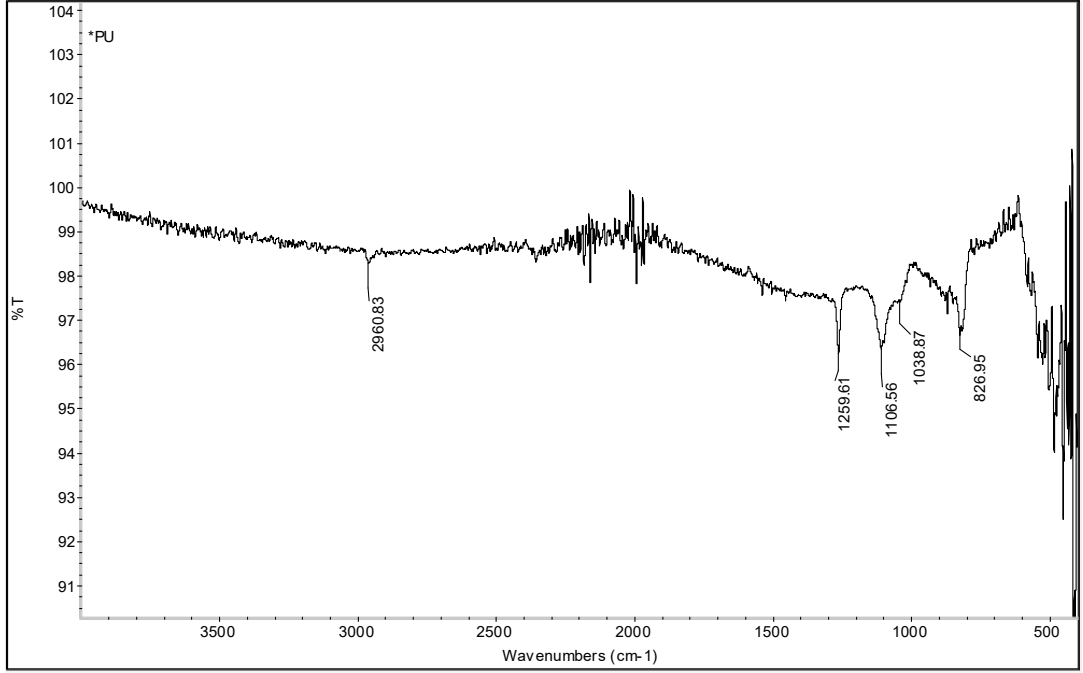
Yapılan ilk çalışmalarda tez kapsamında kullanılan ve herhangi bir şekilde modifiye edilmemiş elektrodun FTIR analizlerinde Şekil 4.4 'de sunulan spektrum elde edilmiş ve spektrumdan da görülebildiği gibi 2960 cm^{-1} $\text{CH}_2=\text{CH}_2$, 1259 cm^{-1} C-O, 1015 cm^{-1} C-O ve 788 cm^{-1} ise C=C bağlarını temsil etmektedir. Burada belirlenen karakteristik piklerin literatürde yer alan örnekler ile olabildiğince uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir [75].



Şekil 4-4 Modifiye edilmemiş kalem grafit elektrodun yüzey FTIR spektrumu

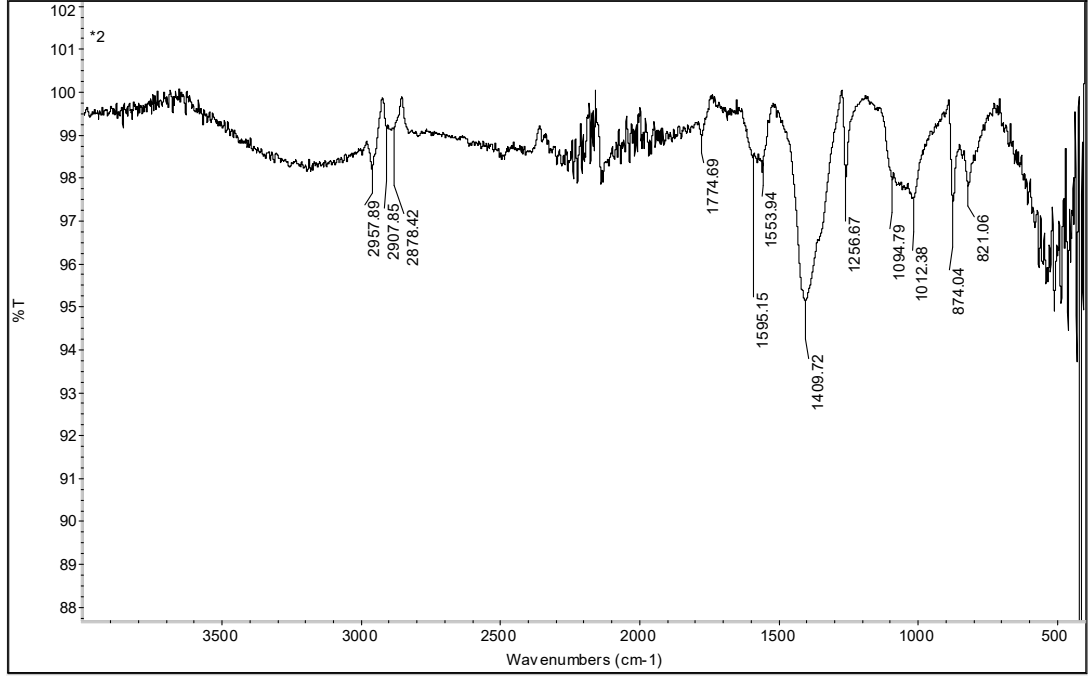
Tez çalışmalarının elektrodun modifiye edildiği bölümde ilk olarak poliüretan polimerinin kullanılması ve breath figüre yöntemi ile mikro-nano gözeneklerin

oluşturulması ve böylelikle yüzey alınan arttırılmasının hedeflendiği çalışmalarda elde edilen modifiye elektrodların FTIR-ATR spektrumlarında 2960 cm⁻¹ CH, 1260 cm⁻¹ ve 1106 cm⁻¹ CN ile 1038 cm⁻¹ C-O-C bağlarının mevcut olduğu anlaşılmıştır. Burada elde edilen değerler/karakteristik piklerin literatürde yapılan ve poliüretan polimerine ait olan piklerle benzerlik gösterdiği ve bu nedenle de grafit elektrodların başarılı bir şekilde poliüretan ile modifiye edildiği sonucuna varılmıştır [76].



şekil 4-5 Poliüretan kullanılarak Breath Figure yöntemi ile modifiye edilen pencil grafit elektrodun FTIR-ATR spektrumu.

Bu bölümde yapılan son incelemelerde hidroksi apatit ile modifiye edilen grafit elektrodlar ile yapılan FTIR-ATR analizlerinden elde edilen FTIR-ATR spektrumu şekil 4.6'da sunulmuştur. HAP ile modifiye edilen elektrodların yüzey analizinde özellikle 1550-1590 cm⁻¹ dolayında çıkan piklerin karbonat iyonlarını yansıtđı, 1100 cm⁻¹ dolayındaki piklerin fosfat iyonlarının ve 820 cm⁻¹ dolayında hidrojen fosfat iyonlarının varlığı ngrlmştir [77].



Şekil 4-6 HAP ile modifiye edilmiş pencil grafit elektrodun FTIR-ATR spektrumu

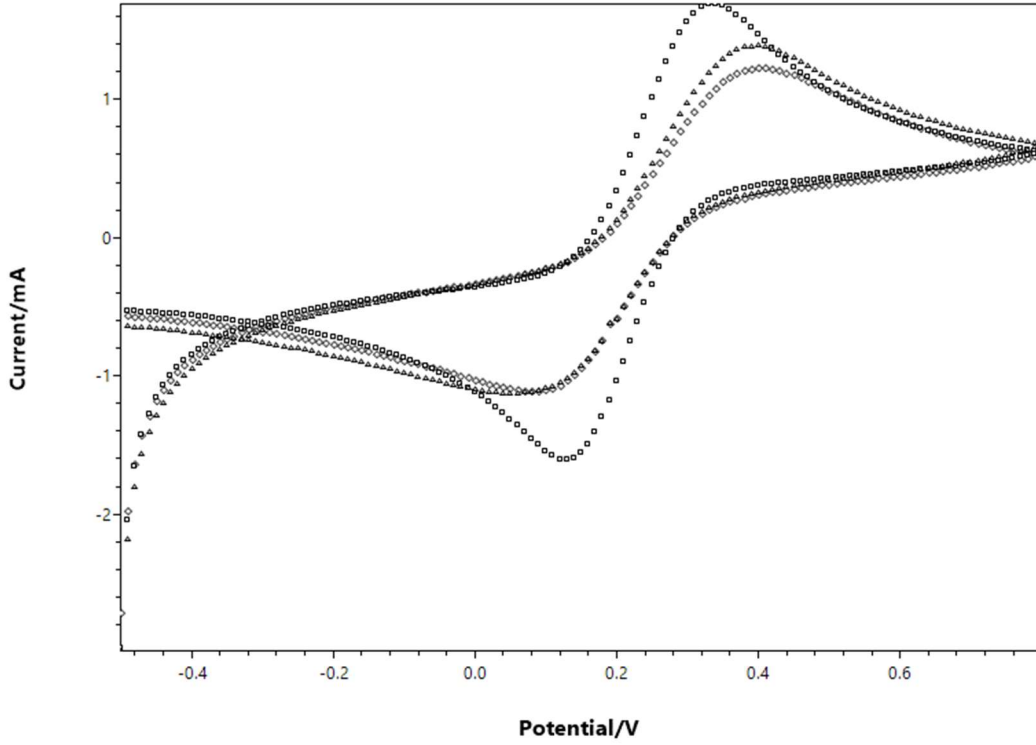
4.2. Elektrokimyasal Analiz Sonuçları

4.2.1. Dönüşümlü voltametri analiz sonuçları

Bakır oksit biriktirilmiş kalem ucu elektrotlar, nefes figürü ile yapılan kalem ucu elektrotlar ve hidroksiapatit biriktirilmiş kalem ucu elektrotların karakterizasyonu dönüşümlü voltametri (CV) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi içerisinde modifiye edilmemiş kalem grafit, 5 dakika boyunca 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.1\text{M}$ NaOH ve 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{M}$ NaOH çözeltisinde bekletilmiş ve kalem grafit elektrotların dönüşümlü voltametrik davranışları grafiklerden incelenmiştir.

Hazırlanmış olduğumuz çözeltilerin miktarı elektrokimyasal sinyallerimizin iyi sonuç vermesi açısından önemli parametredir. Farklı derişimlerde (0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.1\text{M}$ NaOH 1:5, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{M}$ NaOH 1:1) hazırlanmış olduğumuz çözeltilerinin içerisinde kalem grafit elektrotlar daldırılarak 5 dakika boyunca bekletilmiş ve bu elektrotların 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi içerisinde -0.5 ile +0.8 arasında alınan dönüşümlü voltametrik davranışları grafiklerimizden incelenmiştir. En iyi sonuç veren en yüksek pik akımı 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.1\text{M}$ NaOH 1:5 çözeltisine daldırılarak modifiye edilen kalem grafit elektrotlar ile elde edilmiştir. 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.1\text{M}$ NaOH 1:5 derişiminde hazırlanan çözeltimizin elektrot cevabı artmıştır. 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.1\text{M}$

NaOH 1:5 çözeltisi pik akımı incelenen diğer elektrotlara göre daha fazla çıkmıştır. Grafiğimiz birbirine daha çok yaklaşmıştır.



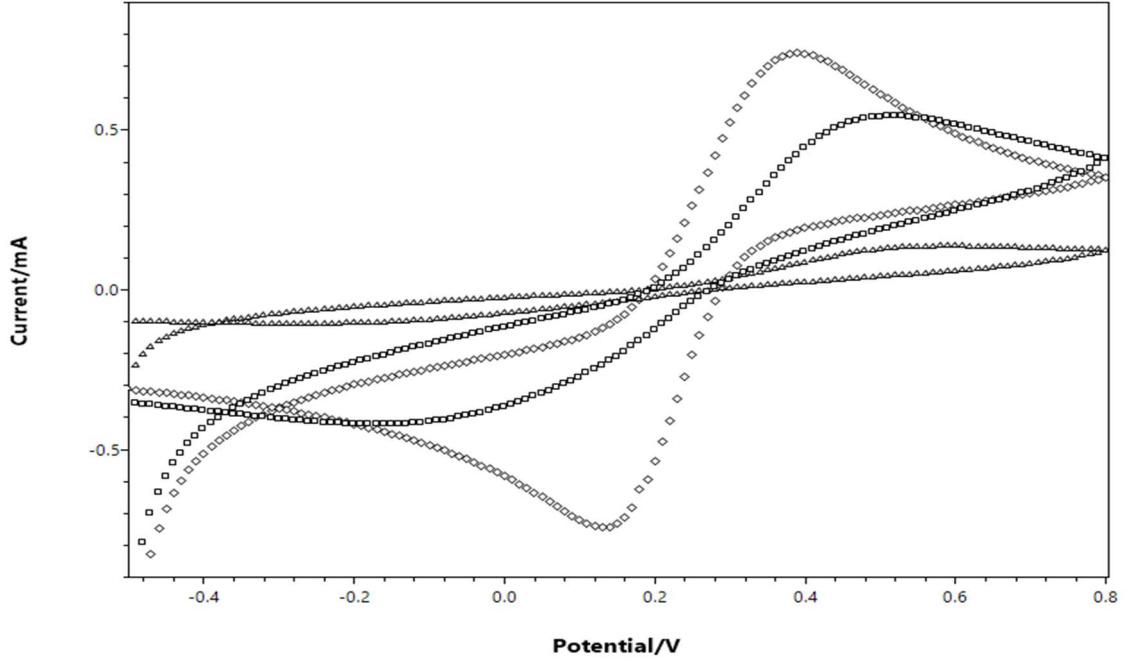
Şekil 4-7 Eşkenar dörtgen modifiye edilmemiş kalem ucu elektrotu, üçgen 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.5M NaOH 1:1 çözeltisini, kare 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.1M NaOH 1:5 çözeltisini temsil etmektedir.

0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.1M NaOH 1:5, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.5M NaOH 1:1 çözeltilerinde modifiye edilmiş kalem ucu grafit elektrotlarımızın 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi içerisindeki dönüşümlü voltametik davranışları gösterilmiştir. CV ölçüm değerlerimiz -0.5 V ile +0.8 V arasında 1V/s tarama hızında alınmıştır.

4.2.1.1. Nefes figürü ile modifiye edilmiş elektrotların analizi

Nefes figürü ile kullanılan çözelti miktarlarının değişimi incelenmiştir. Nefes figürü yöntemi ile poliüretan çözeltisi içerisine kalem grafit elektrotlar 5 dakika daldırılmıştır. Bu yöntemde %75 bağıl nem sağlanmıştır. Aynı yöntem ile sabit poliüretan çözeltisine farklı derişimlerde (0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.1M NaOH 1:3 ve 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.5M NaOH 1:1) hazırlanan çözeltilerinin içerisine poliüretanlı kalem grafit elektrotlar daldırılarak 5 dakika boyunca bekletilmiş ve bu elektrotların 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi

içerisinde -0.5V ile +0.8V arasında dönüşümlü voltametrik davranışı grafikten incelenmiştir. Nefes figürü yöntemi ile kalem elektrot üzerinde daha fazla gözenek oluşturmayı hedeflemiştik. Aşağıdaki grafikte anlaşıldığı gibi tam olarak istediğimiz sonuca erişemedik. En iyi sonuç veren pik akımı modifiye edilmemiş kalem ucu grafit elektrot olarak elde edilmiştir. En yüksek pik akımının modifiye edilmemiş elektrot olarak çıkması kullandığımız yöntemin olumlu sonuç vermediğini açıklamaktadır.



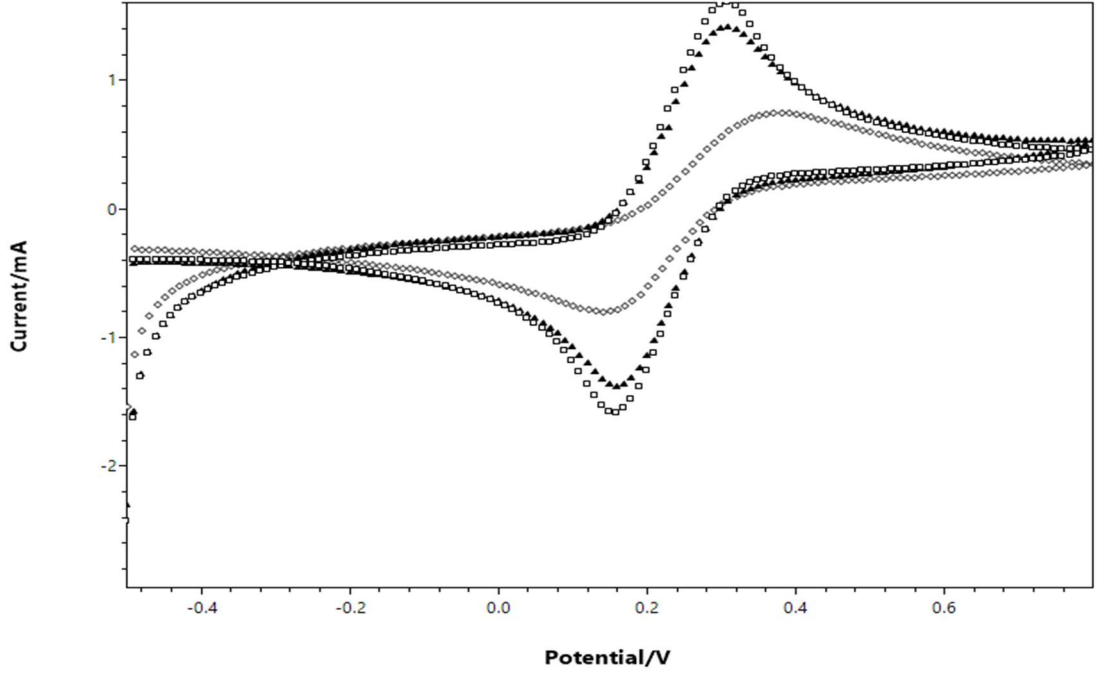
Şekil 4-8 Eşkenar dörtgen modifiye edilmemiş kalem ucu elektrotu, üçgen 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.5M NaOH 1:1 çözeltisini, kare 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.1M NaOH 1:3 çözeltisini temsil etmektedir.

0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.1M NaOH 1:3, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.5M NaOH 1:1 çözeltilerinde modifiye edilen kalem ucu grafit elektrotların 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi içerisindeki dönüşümlü voltametrik davranışları gösterilmiştir. CV ölçüm değerlerimiz -0.5 V ile +0.8 V arasında 1V/s tarama hızında alınmıştır.

4.2.1.2. HAP birikimi ile modifiye edilmiş elektrotların analizi

HAP biriktirme yöntemi ile kullanılan çözelti miktarlarının değişimi incelenmiştir. HAP biriktirme yöntemi ile CaCl_2 ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltileri içerisine kalem grafit elektrotlar sırası ile 5 dakika daldırılmıştır. Daha sonra HAP içerisinde bekletilen

elektrotlar farklı derişimlerde (0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5 ve 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5) hazırlanan çözeltilerinin içerisinde daldırılarak 5 dakika boyunca bekletilmiş ve bu elektrotların 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi içerisinde -0.5V ile +0.8V arasında dönüşümlü voltametrik davranışı grafiklerden incelenmiştir. HAP yöntemi ile kalem grafit elektrot üzerinde daha fazla gözenek oluşturmayı hedefledik. Grafiği incelediğimizde tam olarak istediğimiz sonuca erişmiş olduk. En iyi sonuç veren pik akımları 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5 çözeltisine daldırılarak modifiye edilen kalem ucu grafit elektrotlar ile elde edilmiştir. 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5 derişimine kadar hazırlanan çözeltimizin elektrot cevabı artmıştır. 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5 çözeltisi pik akımı incelenen diğer elektrotlara göre daha fazla çıkmıştır. Grafiğimiz birbirine daha çok yaklaşmıştır.



Şekil 4-9 Eşkenar dörtgen modifiye edilmemiş kalem ucu elektrotu, üçgen 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 çözeltisini, kare 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5 çözeltisini temsil etmektedir.

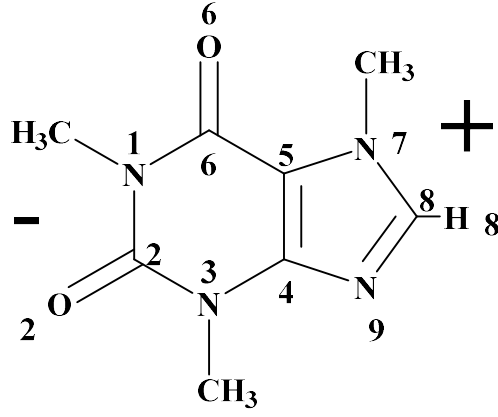
0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 modifiye edilen kalem ucu grafit elektrotların 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi içerisindeki dönüşümlü voltametrik davranışları gösterilmiştir. CV ölçüm değerlerimiz -0.5 V ile +0.8 V arasında 1V/s tarama hızında alınmıştır.

4.3. Elektrokimyasal Yöntemle Kafein Tayini

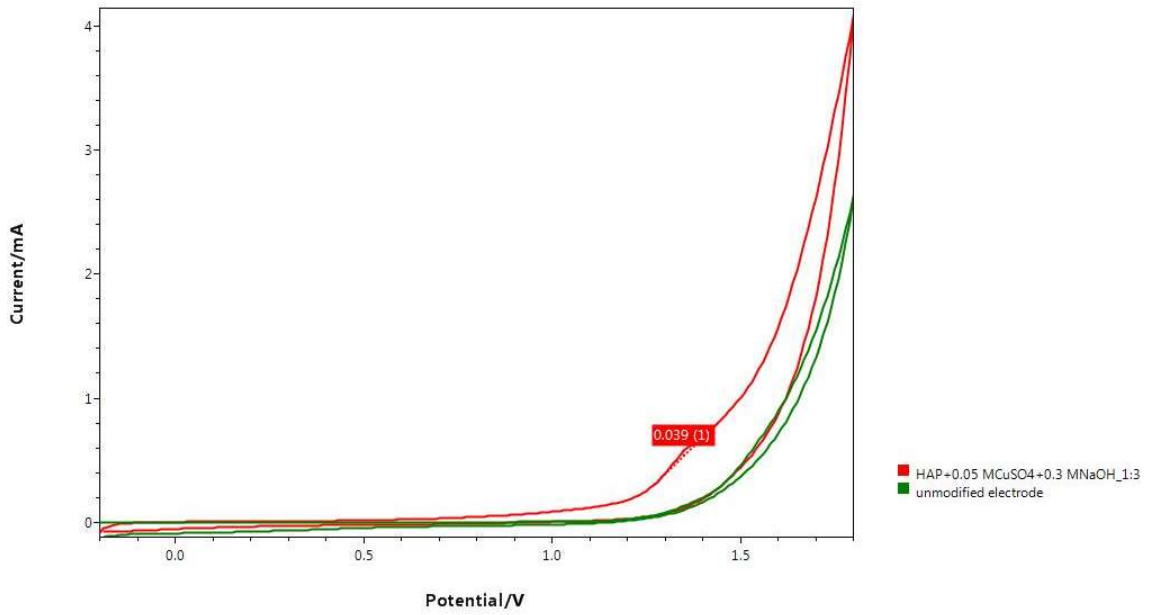
4.3.1. CV ile kafein tayini

Kafein, bir tersiyer amin grubu ve azot atomuna bir karboksil grubunun bağlı olduğu bir amid grubu içermektedir (Şekil 4.10). Bu gruplara ek olarak imin karboksil, metil ve alken gruplarını da yapısında bulundurmaktadır. Karbon-oksijen ve karbon-azot kovalent bağları kafeinin oldukça polar yapmaktadır. Kafeinin moleküler dipolünü yaratan pozitif ve negatif kısımlar diğer zıt yüklü gruplara molekül içi etkileşimlerle güçlü afinite göstermesine neden olmaktadır. Örneğin, elektrot modifikasyonunda yer alan Cu atomlarına. Kafeinin 3 azot atomunun (N1, N3, ve N7) metillenmesiyle kafein azot atomu (N9) ve karbonil oksijen atomlarıyla (O2 ve O6) hidrojen bağı alıcısı olarak davranır [79].

Kafeinin elektrokatalitik oksidasyonunda Cu^{II}/Cu^I redoks çiftinin etkili olup olmadığını belirleyebilmek için modifiye edilmiş elektrot ve modifiye edilmemiş elektrodun kafeine olan elektrokimyasal cevabı incelenmiştir. Şekil 4.11'de 0,5 mM kafein içeren fosfat tampon çözeltisi içerisinde HAP ve 0,05 M $CuSO_4$ + 0,3 M NaOH 1:3 ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrot ve modifiye edilmemiş çıplak elektroda ait dönüşümlü voltamogramlar verilmiştir. Buna göre, modifiye elektrot kafein için 1,35 V'ta oksidasyon akımı vererek oldukça belirgin bir oksidasyon dalgası oluşturmuştur. Elde ettiğimiz bu sonuç literatürdeki sonuçlarla uyumludur [80]. Çıplak elektrotla kıyaslandığında, kafeinin elektrokimyasal oksidasyonunda elektrot modifikasyonunda yer alan Cu metalinin rol aldığı söylenebilmektedir. Kafeinin oksidasyonu toplamda dört elektron ($4e^-$) ve 4 dört protonlu ($4H^+$) oksidatif bir yol içermektedir. İlk adımda, ürik asidi vermek üzere C-8 ila N-9 bağının $2e^-$, $2H^+$ monoelektronik oksidasyonu gerçekleşir. Devamında, kafeinin monoelektronik oksidasyonunda oluşan radikal katyon hızlı bir şekilde ürik asidin 4,5-diol analoglarına $2e^-$, $2H^+$ oksidasyonu ile parçalanmasıdır [80]. Kafeinin birinci oksidasyonunu takiben gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar kafeinin sulu ortamdaki anodik sürecinin geri dönüşümsüz olmasına sebep olur [81].



Şekil 4-10 Kafeinin kimyasal yapısı



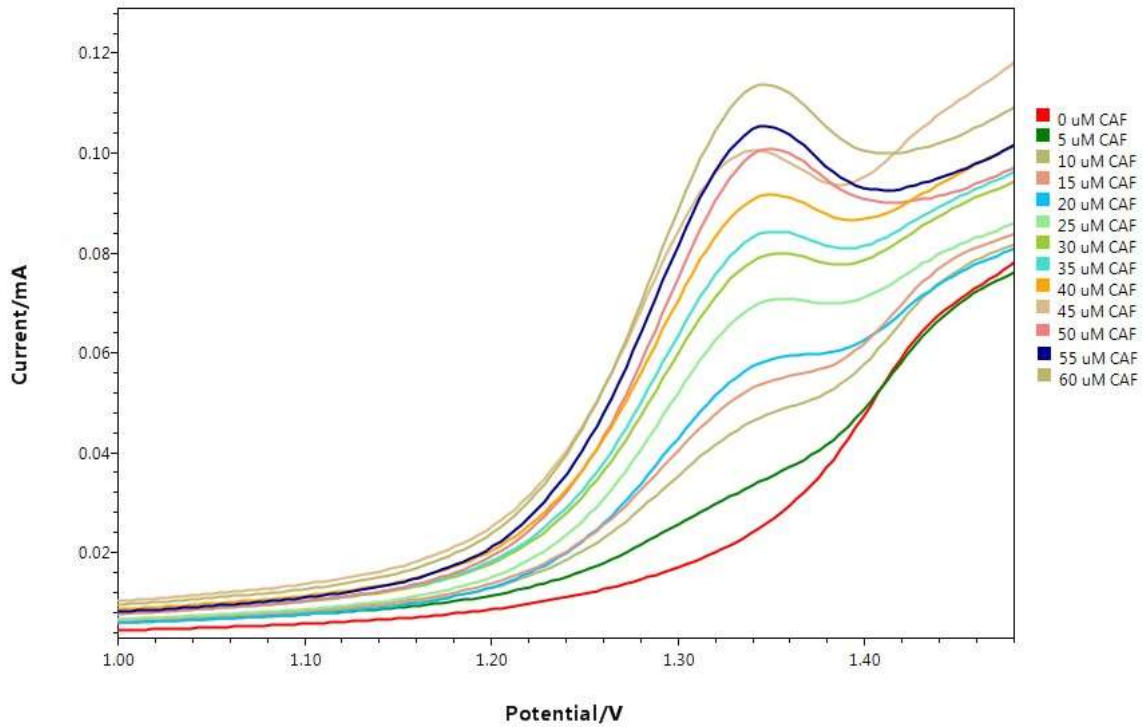
Şekil 4-11 Modifiye edilmiş ve edilmemiş kalem grafit elektrotların 0,5 mM kafein içeren fosfat tampon çözeltisinde Ag/AgCl referans elektroda karşı ölçülen dönüşümlü voltamogramları. (Tarama hızı: 0,05 V s-1)

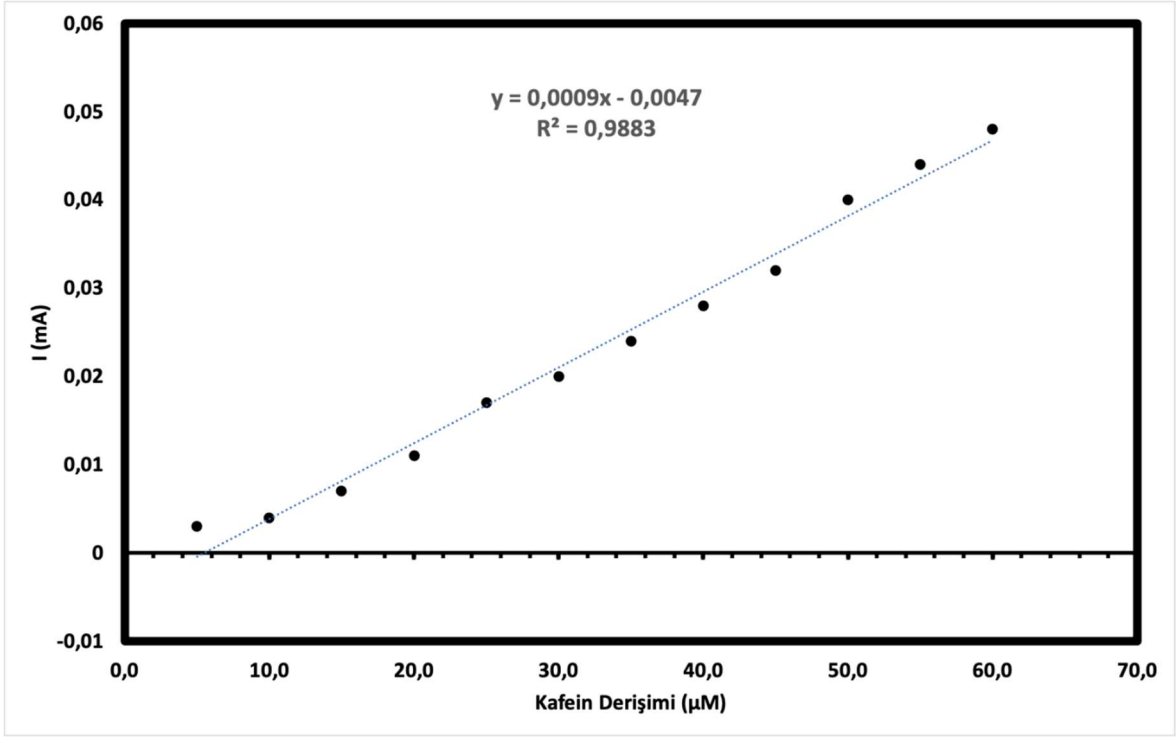
4.3.2. DPV ile kafein tayini

DPV tekniği, yüksek duyarlılığı nedeniyle düşük konsantrasyonlu analitlerin saptanması için sıklıkla kullanılmaktadır. Şekil 4.12, HAP ve 0,05 M CuSO₄ + 0,3 M NaOH 1:5 ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotlar ile fosfat tampon çözeltisi içerisinde kafeinin artan derişiminin diferansiyel puls voltametri ile analizine ait voltamogramlar verilmiştir. Voltamogramlar incelendiğinde, kafeine ait pik akımının kafeinin artan derişimi ile birlikte doğrusal olarak arttığı görülmektedir. Kafeinin oksidasyon pik akımının derişime karşı grafiği incelendiğinde (Şekil 4.13) korelasyon katsayısı 0,9883 olarak hesaplanmıştır. Bu değer kafein derişimi ile oksidasyon pik

akımının doğrusal olarak arttığını göstermektedir. Geliştirilen modifiye uçlarla kafeinin elektrokimyasal olarak tesbit sınırı (limit of detection, LOD) 4,186 μM ($S/N = 3,3$) ve ölçüm sınırı (limit of quantification, LOQ) 12,685 μM ($S/N = 10$) olarak hesaplanmıştır.

Karşılaştırma yapılacak Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen modifiye kalem grafit elektrotlar diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında daha iyi hassasiyet ve geniş bir doğrusal aralıkta ölçüm sağladığı tesbit edilmiştir. Ayrıca, sunulan modifiye elektrodun modifikasyonun oldukça basit olması başka bir üstünlüğüdür.





Şekil 4-13 Kafein artan derişiminin ölçülen pik akımına karşı grafiği.

5. SONUÇ

Sunulan tez kapsamında; doğrudan uyuşturucu madde test/analizlerinde kullanılmak üzere voltametrik ölçüm esaslı bir elektroanalitik sistemin bileşenlerinden olan kalem grafit elektrodun (pencil grafit electrode, PGE) değişik yöntemler ile modifiye edilmesi ve bu amaçla kullanılabilirliğinin ölçülmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, ilk yöntemde PGE'ların yüzeyi ince bir polimerik film ile kaplanmış breath figüre yöntemi ile mikro/nano kuyucuklar oluşturulmuş ve diğer yöntemde de PGE'ların üzerine hidrosiapatit (HAP) kristallerinin çöktürülmesi ile mikro/nano tepcikler oluşturulmuştur.

PGE'ların yüzeylerinde gerçekleştirilen bu modifikasyon işlemlerine elektrod yüzeylerinin bazik ortamda bakır oksitler ile dekore edilmesi şeklinde devam edilmiştir. Bunun için PGE'lar bakır sülfat ile işleme sokularak söz konusu mikro/nano platformların bazik ortamda bakır oksitler şeklinde elektrod yüzeylerinde çöktürülmesi sağlanmıştır. Elde edilen modifiye elektrodlar SEM ile morfolojik olarak değerlendirilmiş; breath figüre yöntemi ile hedeflenen mikro/nano gözeneklerin oluşturulduğu ancak yeterli düzeyde gözenek elde edilemediğinden yüzeye katılan bakır oksitlerin yeterli iletkenlik kazandırmadığı ortaya çıkmıştır. Bir diğer yöntem ile HAP kristallerinin oluşturulduğu yüzeylerde ise iletkenlik ölçümlerinde kaydadeğer bir artış gözlemlenmiştir.

Öte yandan modifiye edilen PGE'ların yüzeyleri FTIR-ATR sistemi ile kimyasal yönden karakterize edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre özellikle modifiye elektrodların geliştirilmesinde kullanılan poliüretan, kalsiyum vb malzeme ve maddelere ait spesifik piklerin varlığı ve bunların literatürde yer alan dalga sayıları arasında yapılan karşılaştırmalar ile gerekli doğrulamalar yapılmıştır.

Çalışmaların elektroanalitik karakterizasyon bölümünde; herhangi bir işleme tabi tutulmamış olan PGE'lar ile değişik yöntemler ile değişik koşullarda gerçekleştirilen modifikasyonlar ile geliştirilen PGE'ların dönüşümlü voltametri (Cyclic voltametry) yardımıyla karakterize edilmiştir. Bu çalışmalarda 0,05 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.5M NaOH 1/1, 1/3 ve 1/5 oranlarında kullanılmış ve optimum performansın elde edildiği elektrodlar (1/5 oranının kullanıldığı örnekler) ile uygulama aşamasına geçilmiştir.

Çalışmanın uygulama aşamasında HAP kristallerinin oluşturulduğu PEG'lar kullanılmıştır. Bu çalışmalarda model uyuşturucu/bağımlılık yapan madde olarak kafein ele alınmış ve fosfat tampon çözeltisi yardımıyla farklı derişimlerde kafein çözeltileri hazırlanarak geliştirilen PGE'lar yardımıyla bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Daha

sonra yapılan çalışmalar derişimi bilinmeyen örnekler kullanılarak kantitatif ölçümler ile geliştirilen platformun etkinliği değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre HAP kristalleri ile modifiye edilen ve sonrasında bakır oksitler ile dekore edilen PEG'lar ile yapılan uygulamalarda kafein ile ilgili olarak minimum tanımlanabilme sınırı (limit of detection, LOD) 4,186 μM (S/N = 3,3) ve ölçüm sınırı (limit of quantification, LOQ) ise 12,685 μM (S/N = 10) olarak belirlenmiştir.

Tez çalışmalarının son bölümünde ise gerçek örnekler olarak halihazırda piyasada mevcut olan poşet çay ve enerji içecekleri kullanılarak ölçümler yapılmış ve bu örneklerin üretici firma tarafından öngörülen kafein içeriklerine yakın değerler geliştirilen PEG'lar yardımıyla ölçülebilmiştir. Burada elde edilen sonuçlara göre; özellikle HAP mikro/nanotepeciklerden oluşan elektrod platformunun hedeflenen uyuşturucu/bağımlılık yapan madde tayininde umut verici olduğu anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] J. Rouquerol, G. Baron, R. Denoyel, H. Giesche, "Makro gözenekli malzemelerin karakterizasyonu için sıvı girişi ve alternatif yöntemler (IUPAC Teknik Raporu) ," Pure Appl. Kimya. Vol. 84, pp.107–136, Dec.2011, doi:10.1351 / pac-rep-10-11-19
- [2] T.Seçkin,B.Ateş, S. Köytepe,B.Aksoy , "Biyosensörlerin Hazırlanmasında Poliüretan Membranlar."Turkchem.net.http://www.turkchem.net/biyosensörlerin_hazırlanmasında -poliüretan-membranlar.html (Accessed:2017.02.03).
- [3] WikiHow,"Uyuşturucu Testinden Kısa Sürede Nasıl Geçilir?,"wikiphow.com.tr. https://www.wikihow.com.tr.https://www.wikihow.com.tr/Uyu%C5%9Fturucu-Testinden-K%C4%B1sa-S%C3%BCrede-Nas%C4%B1l-Ge%C3%A7ilir (Accessed:2020.07.22).
- [4] G.Erdamar, A. Kurupınar, "Ortaöğretim Öğrencilerinde Görülen Madde Bağımlılığı Alışkanlığı ve Yaygınlığı:Bartın İli Örneği,"Sosyal Bilimler Dergisi,vol.16, no.1, pp.65-84,2014.[Online].Available: https://doi.org/10.5578/JSS.7521
- [5] Yeşilay Danışmanlık Merkezi YEDAM , "Madde Bağımlılığı." https://www.yedam.org.tr/madde-bagimliliği.
- [6] R.Güler , R. Koçak, "Uyuşturucu ve Madde Bağımlılığı," Sosyal Bilimler Araştırma Dergisi, vol.1,pp.89-104,2008
- [7] İ.Seyman, "Uyuşturucu Sorununun Türkiyedeki Boyutları," Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü., Ankara Univ., Ankara, Türkiye, 2000.
- [8] K. Ögel, D. Tamar, C.Evren, D.Çakmak , "Lise Gençliği Arasında Sigara, Alkol ve Madde Kullanım Yaygınlığı,"Türk Psikiyatri Dergisi, vol. 12, no.1 , pp.47-52
- [9] Ö.A. Özer, "Orta Öğretim Öğrencilerinin Psikoaktif Madde Kullanımına Yaklaşımı ve Demografik Özellikler," Uzmanlık Tezi, Bakırköy Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesi, İstanbul, Türkiye, pp.18-34, 1991.

- [10] Ü. Yazman, “Lise Gençliğinin Psikoaktif Maddelere Bakışı ve Kullanım Oranlarının Türkiye-İstanbul Örneği ile İncelenmesi,” Uzmanlık Tezi, İstanbul, Türkiye, pp.16, 1995.
- [11] K.Ögel, D.Tamar, “ Uyuşturucu Maddeler ve Bağımlılık Okul Eğitim Paketi,”Öğrenci Anketi Bulguları, Amatem-Özel Okullar Derneği, 1996.
- [12] S.Albayrak, S. Balcı, “ Gençlerde Madde Bağımlılığı ve Önlenmesi,” Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi, vol.11,no.2, pp.30-37, 2014.
- [13] A. Sayım, “Lise Öğrencilerini Bilgilendirmenin Madde Konusundaki Görüşlerine Etkisinin İncelenmesi,” Adli Tıp Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniv.,İstanbul, Türkiye, 2000.
- [14] Group Okyanus , “Uyuşturucu maddelerin Tanımı , Sınıflandırılması ve Yasal Prosedürü.” <http://www.okyanusguvenlik.com/uyusturucu-maddeler.html>
- [15] Wikipedia Özgür Sözlük, “Toksikoloji,” <https://tr.wikipedia.org/wiki/Toksikoloji>
- [16] Türkiye Acil tıp Derneği, ” Klinik Toksikoloji, ” <http://tatdtoksikoloji.org/klinik-toksikoloji>.
- [17] T. Küme, Ç.Karakükcü, A.Pınar, H. Coşkunol, “Yasadışı ve Kötüye Kullanılan Madde Analizlerinin Kapsamı, Kalite ve Güvenlik Gereklilikleri,” Türk Psikiyatri Dergisi, vol.23, no:3, pp.198-207, 2017.
- [18] T. Küme, Ç.Karakükcü, A.Pınar, N.K. Uzun, “Tıbbi Laboratuvarlarda Madde Analizleri,” Türk Klinik Biyokimya Dergisi., vol. 14, no. 1, pp. 58-71, 2016..
- [19] Türkiye Bağımlılıkla Mücadele Eğitim Programı Yeşilay, “TBM_Yetişkin_Madde,” <http://tbm.org.tr>
- [20] E.F.Melanson,”Drug-of-Abuse Testing at the Point of Care,” Clin Lab Med., vol.29,pp. 503-509,2009

- [21] E.F.Melanson," The Utility of Immunoassays for Urine Drug Testing," Clin Lab Med., vol.32,pp. 429-447,2012
- [22] Y.V.Zhang, B.Wei, et al. "Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: An Emerging Technology in the Toxicology Laboratory." Clinics in laboratory medicine,vol. 36, no.4 pp. 635-661,2016.
- [23] Turner, Anthony, Isao Karube, and George S. Wilson. Biosensors: fundamentals and applications. Oxford university press, 1987.
- [24] Datta, A. K. "Novel chemical and biological sensors for monitoring and control of food processing operations." Journal of food engineering vol.12,no.3, pp.223-238, 1990.
- [25] Renneberg, Reinhard, et al. "Frieder Scheller and the short history of biosensors." Biosensing for the 21st Century. Springer, Berlin, Heidelberg, pp.1-18, 2007.
- [26] Caduff, A., et al. "Non-invasive glucose monitoring in patients with diabetes: A novel system based on impedance spectroscopy." Biosensors and Bioelectronics,vol. 22,no.5,pp. 598-604,2006.
- [27] G.G. Guilbault, J.G. Montalyo,"Urea-specific enzyme electrode,"Journal of the American Chemical Society,vol.91, no.8, pp.2164-2165,1969.
- [28] Van Hal, R. E. G., J. C. T. Eijkel, and P. Bergveld. "A novel description of ISFET sensitivity with the buffer capacity and double-layer capacitance as key parameters." Sensors and Actuators B: Chemical vol.24,no.1-3 pp. 201-205, 1995.
- [29] M.C.Vestergaard, K.Yamanaka, "Printable Electrochemical Biosensors: A Focus on Screen-Printed Electrodes and Their Application ," Sensors, vol. 16, pp. 1761, 2016.
- [30] Yoo, E. H.,"Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice," Sensors. Vol. 10,pp.4558–4576, 2010.

- [31] S.Suzuki, F. Takahashi, "Ethanol and lactic acid sensors using electrodes coated with dehydrogenase-collagen membranes," *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol.48, pp.3246-3249, 1975.
- [32] J.S.Suzuki, "Optical Sensor of Plasma Constituents", Goggle Patent 1982.
- [33] B. Liedberg, "Surface Plasmon Resonance for gas detection and Biosensing," *Sensors and Actuators*, vol.4, pp.299-304, 1983
- [34] A..E.G. Cass, G.Davis, "Ferrocene-mediated enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose," *Analytical Chemistry*, vol.56, no.4, pp.667-671, 1984
- [35] A. Şavk, "Şeker Hastalığının Erken Dönemde Tanısına Yönelik Yeni Nesil Sensörlerin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Uygulamaları," *Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniv.,Kütahya, Türkiye*, 2019.
- [36] Z.Tüylar, "Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşimler," *BEU Journal of Science*, vol.6, no.2, pp.71-80, 2017
- [37] Wikipedia, "Reseptör," <https://tr.wikipedia.org/wiki/Reseptör>
- [38] Z. Şerbetçi, C. Alkan, "4-(1h-İmidazo[4,5-F][1,10]Fenantrolin-2-İl)-N,N'-Dimetilbenzenamin Ligandı ve Metal Komplekslerinin Sentez ve Karakterizasyonu," *Fırat Üniversitesi Fen ve Müh. Bilim Dergisi*, vol. 20, no.1, 91-97, 2008.
- [39] P. Akbayırlı, E. Akyılmaz, "Activation-based Catalase Enzyme Electrode and Its Usage for Glucose Determination," *Analytical Letters*, vol.40, pp. 3360-72, 2007.
- [40] E.A.H. Hall, "Ch.1: Biosensors in context," *Biosensors*, Open University Press, İngiltere, pp.3-30, 1990.
- [41] N. Singh, B.Manshian, "Nanogenotoxicology: The DNA Damaging Potential of Engineered Nanomaterials," *Biomaterials*, vol.30, no.23-24, pp. 3891-914, 2009.

- [42] Ş.G.Yeşiller, “Enzim Aktivitesinin Tayinine Yönelik Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensör Geliştirilmesi,” Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniv.,Tekirdağ, Türkiye, 2014.
- [43] Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra, “Application of conducting polymers to biosensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol.17,no.5, 345-359, 2002.
- [44] T.Özkaya Ferak,”Baskılı Elektrokimyasal ELİZA (Printecelisa)Amperometrik Biyosensörü İle Beta-Kazomorfin-7(BKM-7) Tayin Methodunun Geliştirilmesi,” Biyoloji Anabilim Dalı, Lisans Tezi, Erciyes Üniv., Kayseri, Türkiye,2018.
- [45] Y.Li, “Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology,” in *Biosensors*, American Society of Agricultural Engineers: ASABE, 2006, ch. 2, sec. 2.3, pp. 52-93. [Online]. Available:[http:// www.tarmakbirorg/haberler/Kitap/5_2.3%20Biyosens%C3%B6rler](http://www.tarmakbirorg/haberler/Kitap/5_2.3%20Biyosens%C3%B6rler).
- [46] Wikipedia,”Enzim Kinetiği,” https://tr.wikipedia.org/wiki/Enzim_kinetiği
- [47] B.D. Malhotra, A.Chaubey, “ Biosensor for clinical diagnostics industry, “ *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol.91,pp.117-127,2003.
- [48] C. Davis, “*Annals Microbiol*,” 126A: 175-186,1975.
- [49] G.A. Rechnitz, ”Biochemical electrodes uses tissues slice,” *Chem. Eng. News* vol.56,pp. 16-21,1978.
- [50] L.C. Clark, C. Lyons, “Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery,” *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 105,pp. 20-45, 1962.
- [51] A. Mulchandani, P. Mulchandani, W. Chen, “Enzyme biosensor for determination of organophosphates,” *Field Analytical Chemistry and Technology*, vol.2, no.6,pp. 363-369,1998.
- [52] B.M. Paddle, “Biosensors for chemical and biological agents of defence interest, “*Biosensors & Bioelectronics*,vol.11, pp.1069-1079,1996.

- [53] M.Özer ,” Kurşun Kalem Elektrot İle Podofilotoksin’İN Elektroanalitik Özelliklerinin İncelenmesi Ve Miktar Tayini ,”Kimya Anabilim dalı,Yüksek Lisans Tezi,Batman Üniv. ,Batman, Türkiye, 2019
- [54] J.Wang, A.N. Kawde, E. Sahlin, “ Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA, “Analyst, vol.125, pp.5-7,2000.
- [55] J.Wang, A.N. Kawde, “Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization,” Analytica ChimicaActa, vol.431,pp. 219-224,2001.
- [56] A. Levent, Y. Yardım, Z. Şentürk, “Voltammetric behavior of nicotine at pencil graphite electrode and its enhancement determination in the presence of anionic surfactant,” Electrochimica Acta, vol.55,pp.190-195,2009.
- [57] A.Özcan, M.Gürbüz, A.A. Özcan, “Preparation of a disposable and low-cost electrochemical sensor for prothiamine detection based on over-oxidized poly(thiophene) modified pencil graphite electrode,” Talanta vol.187, pp.125-132 ,2018.
- [58] A. Torrinha,C.G. Amorim, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araujo, “Biosensing based on pencil graphite electrodes,” Talanta, vol.190, pp.235-247,2018.
- [59] J.K. Kariuki, “ An electrochemical and spectroscopic characterization of pencil graphite electrodes,” Journal of the Electrochemical Society, vol. 159, no.9, pp. H747- H751,2012.
- [60] A.Erdinç ,” Eriochrome Black T Modifiye Kalem Grafit Elektrot İle Voltammetrik Atorvastatin Tayini,”Kimya Anabilim dalı,Yüksek Lisans Tezi,Balıkesir Üniv. ,Balıkesir, Türkiye, 2019.
- [61] Rayleigh and A. John, “Breath Figures,” Nature, vol. 86, no. 2172, pp. 516– 517, 1911.
- [62] Rayleigh, “Breath Figures,” Nature, vol. 86, pp. 416-417, 1911.

- [63] Y. Dou, M. Jin, G. Zhou, and L. Shui, “Breath Figure Method for Construction of Honeycomb Films,” *Membranes (Basel)*, vol. 5, no. 3, pp. 399–424, Aug. 2015.
- [64] G. Widawski, M. Rawiso, B. François, “ Self-organized honeycomb morphology of star-polymer polystyrene films,” *Nature*, vol. 369, pp. 387–389, 1994
- [65] H. Bai, C. Du, A. Zhang, and L. Li, “Breath Figure Arrays: Unconventional Fabrications, Functionalizations, and Applications,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 52, no. 47, pp. 12240–12255, Nov. 2013.
- [66] F. Galeotti, F. Trespici, M. Pasini, “Breath Figure-Assisted Fabrication of Nanostructured Coating on Silicon Surface and Evaluation of Its Antireflection Power,” *Journal of Nanomaterials*, vol. 2016, pp. 8, 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1155/2016/3502310>
- [67] D. Wu, F. Xu, B. Sun, R. Fu, H. He, and K. Matyjaszewski, “Design and Preparation of Porous Polymers,” *Chem. Rev.*, vol. 112, no. 7, pp. 3959–4015, Jul. 2012.
- [68] Q. Liu et al., “Design, Preparation, and Application of Ordered Porous Polymer Materials,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 144, no. 3, pp. 213–225, Apr. 2014.
- [69] L. Heng, B. Wang, M. Li, Y. Zhang, and L. Jiang, “Advances in Fabrication Materials of Honeycomb Structure Films by the Breath-Figure Method,” *Materials (Basel)*, vol. 6, no. 2, pp. 460–482, Feb. 2013.
- [70] M. Hernández-Guerrero, M. H. Stenzel, “Honeycomb Structured Polymer Films via Breath Figures,” *Polym. Chem.*, vol. 3, no. 3, pp. 563–577, Feb. 2012.
- [71] U. H. F. Bunz, “Breath Figures as a Dynamic Templating Method for Polymers and Nanomaterials,” *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 8, pp. 973–989, Apr. 2006.
- [72] A. Muñoz-Bonilla, M. Fernández-García, and J. Rodríguez-Hernández, “Towards hierarchically ordered functional porous polymeric surfaces prepared by the breath figures approach,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, no. 3, pp. 510–554, 2014.

- [73] N. Bhalla, M. Di Lorenzo, G. Pula, P. Ve Estrela, “ Protein phosphorylation detection using dual-mode field-effect devices and nanoplasmonic sensors,” *Scientific Reports*, vol.5, pp.8687,2005.
- [74] M. Gavrilescu, K. Demnerova, J. Aamand, “ Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation,” *New Biotechnology*, vol.32, pp.147–156,2015.
- [75] N. Vishnu, M. Gandhi, S. Badhulika, A.S. Kumar, “ Tea quality testing using 6B pencil lead as an electrochemical sensor,” *Analytical Methods*, vol.10, no.20, pp.2327-2336, 2018.
- [76] A. Asefnejad, M.T. Khorasani, A. Behnamghader, B. Farsadzadeh, S. Bonakdar, “Manufacturing of biodegradable polyurethane scaffolds based on polycaprolactone using a phase separation method: physical properties and in vitro assay,” *International journal of nanomedicine*, vol.6, pp. 2375,2011.
- [77] H. Gheisari, E. Karamian, M. Abdollahi, “A novel hydroxyapatite–Hardystonite nanocomposite ceramic,” *Ceramics International*, vol.41,no.4,pp. 5967-5975,2015.
- [78] Wikipedia, “Kafein,” <https://tr.wikipedia.org/wiki/Kafein#>
- [79] J. Jose, V. Subramanian, S. Shaji, P.B. Sreeja, “An electrochemical sensor for nanomolar detection of caffeine based on nicotinic acid hydrazide anchored on graphene oxide (NAHGO),” *Scientific Reports*, vol.11, no.1 pp. 11662,2021.
- [80] A.J. Jeevagan, S.A. John, “Electrochemical determination of caffeine in the presence of paracetamol using a self-assembled monolayer of non-peripheral amine substituted copper(II) phthalocyanine,” *Electrochimica Acta*, vol.77, pp.137-142,2012.
- [81] A. Trani, R. Petrucci, G. Marrosu, D. Zane, A. Curulli, “Selective electrochemical determination of caffeine at a gold-chitosan nanocomposite sensor: May little change on nanocomposites synthesis affect selectivity? ,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol.788, pp. 99-106, 2017.

