



Organik-İnorganik Hibrit İletken Polimer Sentezi, Elektrokromik ve Biyosensör Uygulamaları

Proje No: 111T074

Doç.Dr. Metin AK

Doç.Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

Doç.Dr. Mehmet KARAKUŞ

Rukiye AYRANCI

Tuğba SOĞANCI

KASIM 2013

ANKARA





ÖNSÖZ

111T074 nolu Tübitak Projesinin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	xiii
1. GİRİŞ	2
1.1 Elektrokromik Malzemeler	2
1.2 Döngülü Voltametre	4
1.3 Spektroelektrokimyasal Ölçümler.....	4
1.4 Biyosensörler	5
1.4.1 Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri	6
2. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar	8
2.1 Araç ve Gereçler	8
2.1.1 Proje Bütçesinden Satın Alınan Teçhizatlar	8
3. Tüm Maddelerin Sentez Şemaları ve Elektrokromik Özellikleri	9
3.1 O-2-(tiyofen-3-yl)etil ferrosenil ditiyofosfonat (ThFc).....	9
3.1.1 ThFc' nin Sentezi.....	9
3.1.2 ThFc' nin Redoks özellikleri ve Polimerleştirilmesi.....	11
3.1.3 ThFc' nin Yüzey özellikleri.....	11
3.1.4 P(ThFc)' nin spektroelektrokimyasal özellikleri	12
3.1.5 O-2-(thiophen-3-yl)ethyl ferrocenyl dithiophosphonat'ın (ThFc) Nikel Kompleksinin(ThFc-Ni) Sentezi.....	14
3.1.5 P(Th), P(ThFc) ve P(ThFc-Ni) spektroelektrokimyasal özellikleri	16
3.2 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)bütan-1-amin (TPA).....	18
3.2.1 TPA' nın Sentezi	18
3.2.2 TPA' nın ¹ H-NMR Spektrumu	18
3.2.3 TPA' nın elektrokimyasal polimerleştirilmesi	19
3.2.4 P(TPA)' nın Tarama Hızına Bağlı Pik Akım Değerleri	20
3.2.5 P(TPA)' nın spektroelektrokimyasal özellikleri	21
3.2.6 TPA'nın EDOT ile kopolimerleştirilmesi	22
3.2.7 P(TPA-co-EDOT)'un sentezi	23
3.2.8 P(TPA) ve P(TPA-co-EDOT) Pik Akım Değerlerinin Tarama Hızı ile Değişimi.....	23
3.2.9 P(TPA-co-EDOT)'un spektrokimyasal özellikleri	24
3.2.10 Filmlerin İletkenlikleri.....	26
3.2.11 Jel Elektrolit Hazırlanması.....	27
3.2.12 Elektrokromik Cihazların Hazırlanması (ECDs)	27



3.2.13. Kolorimetri.....	30
3.2.14. Renk Değişimi	31
3.3 Bis(4-(3-tiyenil etilen)-oksikarbonil)diazobenzen(TDAZO)	32
3.3.1 TDAZO sentezi	32
3.3.2 TDAZO'ya ait NMR ve FTIR Spektrumları.....	34
3.3.3 TDAZO'nun Elektrokimyasal Özellikleri	35
3.3.4 TDAZO'nun Foto ve Termo Duyarlı Davranışı.....	35
3.3.5 P(TDAZO-co-Th)'nun Spektroelektrokimyası.....	37
3.3.6 İmmobilize Edilmiş Enzimlerin Kinetik Parametreleri	38
3.3.7 Enzim Aktivitesine pH Etkisi	39
3.3.8 Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	39
3.3.9 Enzim Elektrodunun Operasyonel Kararlılığı.....	39
3.4 2-Hidroksi Karbazol Ferrosenil Ditiyofosfanat (Cz-Fc)	40
3.4.1 2-Hidroksi Karbazol Ferrosenil Ditiyofosfanat (Cz-Fc)Sentezi ve Elektrokimyasal Özellikleri	40
3.4.3 P(Cz-Fc)'ye Ait Tepki Zamanı	43
3.4.4 Cz-Fc'nin BFEE Destek Elektrolit Varlığında Elektrokimyasal Özellikleri.....	43
3.4.5 P(Cz-Fc)' e Ait Tarama Hızına Bağlı Pik Akım Değerleri	45
3.4.6 Cz-Fc'nin BFEE Destek Elektrolit Varlığında Spektroelektrokimyasal Özellikleri	45
3.4.7 P(Cz-Fc) İçin Tepki Zamanı	46
3.5 2-bütül-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]diokso[6,7-b]kinoksalin (BuDQP).....	48
3.5.1 2-bütül-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]diokso[6,7-b]kinoksalin Sentezi	48
3.5.2 2-bütül-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]diokso[6,7-b]kinoksalin'in Pirol(Py) ile kopolimerleştirilmesi.....	52
3.5.3 BuDQP'a ait Dönüşümlü Voltametri Grafikleri	53
3.5.4 P(BuDQP) ve P(BuDQP-co-Py)' e ait Spektroelektrokimyasal Çalışmalar	55
3.5.5 Kolorimetri.....	56
3.5.6 Tepki Zamanı	58
3.5.7 Tarama hızının polimerleşmeye etkisi.....	59
3.5.8 Stabilite.....	60
3.6 4-amino-N-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)benzamid (HKCN)	62
3.6.1 HKCN'nin Sentezi ve Elektrokromik Özellikleri.....	62
3.6.2 HKCN'nin EDOT ile Elektrokimyasal Kopolimerizasyonu	64
3.6.3 Dönüşümlü voltametri.....	64



3.6.4 Tarama hızına bağlı pik akım değerleri.....	65
3.6.5 P(HKCN)'nin Elektrokromik Özellikleri.....	66
3.6.6 Switching	68
3.6.7 Besleme oranına karşı kopolimer kompozisyonu.....	69
3.6.8 P(HKCN)'nin Redoks Stabilitesi.....	72
3.6.9 HKCN'nin Biyosensör Uygulamaları ve Yöntemler	74
3.6.9.1 Oksijen Tüketiminin Amperometrik Olarak İzlenmesi.....	74
3.6.9.2 HKCN/G. <i>oxydans</i> Biyosensörlerinin Hazırlanması.....	74
3.6.9.3 HKCN/G. <i>oxydans</i> Biyosensörleri ile Ölçüm İlkesi	75
3.6.10 Kesikli (batch) sistem ile yapılan çalışmalar	75
3.6.10.1 Optimum pH'nın Belirlenmesi.....	75
3.6.10.2 Biriktirme Süresinin Optimizasyonu	75
3.6.10.3 Hücre Miktarının Optimizasyonu	75
3.6.10.4 HKCN/G. <i>oxydans</i> Biyosensörlerinin Karakterizasyonu.....	76
3.6.11 FIA-HKCN/G. <i>oxydans</i> Biyosensörüne ilişkin çalışmalar	76
3.6.11.1 Analitik karakterizasyon	76
3.6.11.2 Substrat Spesifikliği	77
3.6.11.3 Farklı Bileşiklerin Biyosensör Cevabına Girişim Etkisinin Belirlenmesi.....	77
3.6.12 Batch Uygulamalarda Elde Edilen Bulgular	77
3.6.12.1 <i>G. oxydans</i> Hücrelerini Temel Alan Biyosensörlerin Optimizasyonuna İlişkin Veriler. 78	
Biriktirme Süresinin Optimizasyonu	78
Hücre Miktarının Optimizasyonu	79
3.6.13 HKCN/G. <i>oxydans</i> Biyosensörlerinin Karakterizasyonu.....	80
3.6.14 FIA Uygulamaları	81
3.6.14.1 Doğrusal Tayin Aralığı.....	81
3.6.14.2 Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Yeniden Üretilbilirlik.....	82
3.6.14.3 Operasyonel Stabilitate	83
3.6.14.4 Substrat Spesifikliği	84
3.6.14.5 Farklı Bileşiklerin Biyosensör Cevabına Girişim Etkisinin Belirlenmesi.....	85
3.6.14.6 Örnek Uygulama.....	85
3.7 [FcP(=S)(μ-S)] ₂ ile 4-(1-H-Pirol-1-yl) fenol reaksiyonu (TP-Fc).....	86
3.7.1 TP-Fc'in sentezi.....	86
3.7.2 TP-Fc Monomerine Ait 1H-NMR ve FTIR Spektrumu.....	86



3.7.3 TP-Fc' nin Farklı Çözücülerdeki Redoks özellikleri ve Polimerleştirilmesi	88
3.7.3.1 TP-Fc' nin Diklorometan (DCM) içerisindeki Redoks özellikleri ve Polimerleştirilmesi .	88
3.7.3.2 TP-Fc'nin Asetonitril (ACN) içerisindeki Redoks özellikleri ve Polimerleştirilmesi	88
3.7.4 TP-Fc' nin Farklı Çözücülerdeki Redoks özellikleri ve Pirel İle Kopolimerleştirme Çalışmaları	89
3.7.4.1 TP-Fc' nin Diklorometan (DCM) içerisinde Pirel(Py) ile Kopolimerleştirme çalışması...	89
3.7.4.2 TPFC/Py Kopolimerinin (P(TPFC-co-Py)) DCM içerisindeki spektroeletrokimyasal özellikleri	90
3.7.4.3 TP-Fc' nin Asetonitril (ACN) içerisinde Pirel (Py) ile Kopolimerleştirme çalışması	90
3.7.5 Biyosensör Uygulamaları	92
3.7.5.1 Enzim Elektrodu Hazırlanması	92
3.7.5.2 Elektrot Performans Çalışmaları	92
3.7.5.3 Ferrosenin Redoks Özelliğinden Faydalanarak Amperometrik Olarak Sensör Cevabının İzlenmesi.....	92
3.7.5.4 Lineweaver-Burk Km, I _{max} Değerlerinin Hesaplanması	93
3.7.5.5 pH Optimizasyonu	94
3.7.5.6 Enzim Elektrodunun Kalibrasyonu.....	95
3.7.5.7 Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği	96
3.7.5.8 Örnek Uygulama.....	96
3.7.5.9 Girişimci Testi	96
3.7.5.10 Enzim Elektrodunun Dönüşümlü Voltametri İncelemesi	97
3.8 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirel-1yl)anilin (RF) ve 3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirel-1yl)anilin.....	99
3.8.1 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirel-1yl)anilin (RF) ve 3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirel-1yl)anilin Sentezi ve Elektrokimyasal Özellikleri	99
3.8.2 RF ve RMF nin Tarama Hızına Bağlı Pik Akım Değerleri.....	102
3.8.3 RF ve RMF' nin Spektroeletrokimyasal Özellikleri	103
3.8.4 Biyosensör Uygulamaları	106
3.8.4.1 Elektrot Yüzeyine Kaplanan RF Maddesinin Optimizasyonu	106
3.8.4.2 Elektrot Yüzeyine Kaplanan RMF Maddesinin Optimizasyonu	106
3.8.4.3 pH Optimizasyonu	107
3.8.4.4 Glukoz Biyosensörünün Karakterizasyonu	108
3.8.4.5 Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği	109
3.8.4.6 Örnek Uygulama.....	109
3.9 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirel-1-yl)anilin (RF-Fc).....	110



3.9.1 RF-Fc Sentezi.....	110
3.9.2 RF-Fc ile 3,4-Ethylenedioxythiophene (EDOT) Kopolimerizasyonu.....	112
3.9.3 Dönüşümlü Voltametri Grafikleri	113
3.9.4 Tarama Hızına Bağlı Pik Akım Değerleri.....	115
3.9.5 Spektroelektrokimyasal Özellikler	116
3.9.6 Monomer besleme oranına karşı kopolimer kompozisyonunun değişimi.....	121
3.9.7 Kopolimerleşmeye Uygulanan Polimerleşme Potansiyelin Etkisi.....	123
3.9.8 Tepki Zamanı	127
3.9.9 In-Situ Polimerizasyon	129
3.9.10 Biyosensör Çalışmaları.....	130
3.9.10.1 Elektrot Yüzeyine Kaplanan Kopolimer Oranının Optimizasyonu	130
3.9.10.2 pH Optimizasyonu	131
3.9.10.3 Glukoz Biyosensörünün Karakterizasyonu	132
SONUÇ	135
Kaynakça.....	145



Şekiller Listesi

Şekil 1. İletken polimerlerin uygulanan farklı potansiyellerdeki renkleri ve absorpsiyon spektrumları..	2
Şekil 2. Spektroelektrokimyasal denemelerin yapıldığı düzenek	4
Şekil 3. Bir biyosensörün şematik gösterimi.....	5
Şekil 4. Biyosensör elementleri	6
Şekil 5.a. Gamry Referans 600 potentiostat-galvanostat cihazı b. Agilent 8453 UV-visible diode array spektrofotometre.....	8
Şekil 6. ThFc ve P(ThFc) sentez şeması	9
Şekil 7. ThFc' nin ¹ H-NMR (a), ¹³ C-NMR (b) ve ³¹ P-NMR (c) spekturumu.....	10
Şekil 8. ThFc (a) ve Th (b) bileşiklerine ait BFEE içinde 200 mV/s tarama hızında alınmış Döngüsel Voltamogramlar	11
Şekil 9. P(ThFc) (a) ve P(Th) (b) bileşiklerine ait SEM görüntüleri	12
Şekil 10. P(ThFc)' nin spektroelektrokimya deneyi sonucunda elde edilen grafiği (a) ve P(ThFc)'nin BFEE içindeki redoks renkleri: (b) yeşil renk 0,0 V'ta (L:71,a:-27, b:52), (c) Mavi renk +1,2 V'ta (L:47, a:3, b:-30).	12
Şekil 11. P(Th)' nin spektroelektrokimya deneyi sonucunda elde edilen grafiği (a) ve P(Th)'nin BFEE içindeki redoks renkleri: (b) kırmızı renk -0,8 V'ta (L:42,a:36, b:31), (c) Mavi renk +0,8 V'ta (L:46, a:3, b:-26).	13
Şekil 12. ThFc (a) ve ferrosenin (b) asetonitril (ACN) ve BFEE çözücülerindeki UV spektrumları	14
Şekil 13. THFc-Ni kompleksinin sentez şeması	14
Şekil 14. ThFc-Ni ¹ H-NMR ve ³¹ P-NMR spektrumları	15
Şekil 15. ThFc-Ni'ye ait Dönüşümlü Voltamogram (a) ThFc-Ni ve Th (b))200 mV/s tarama hızında (1:1) BFEE/ACN içinde).....	16
Şekil 16. Spektroelektrokimya (a) P(ThFc-Ni)'in BFEE-ACN (1:1) içerisindeki yükseltgenmiş haldeki rengi (b) +1.6 V'da mavi renk (L:49,a:1, b:-14) (c) -0.5 V'da Yeşil renk (L:77, a:-3, b:42).....	17
Şekil 17. ThFc, ThFc-Ni, ve Th'in spektroelektrokimyasal özellikleri ve redoks renkleri	17
Şekil 18. TPA' nın sentez şeması.....	18
Şekil 19. TPA monomerinin ¹ H-NMR spektrumu	19
Şekil 20. TPA'nın -DCM (9:1 v:v) içerisinde LiClO ₄ destek elektrolit varlığında 250 mV tarama hızı uygulanarak alınan döngüsel voltametre grafiği	19
Şekil 21. TPA'nın elektrokimyasal polimerleşme mekanizması.....	20
Şekil 22. Farklı tarama hızlarında (0.02 V– 0.3 V/s) P(TPA)'e ait dönüşümlü voltametri grafiği	21
Şekil 23. P(TPA)' nın iki ve üç boyutlu spektroelektrokimyasal grafiği ve nötral (açık sarı) ve yükseltgenmiş (mavi) hallerinin renkleri	22
Şekil 24. P(TPA) ve P(TPA-co-EDOT)'un sentez şeması.....	22
Şekil 25. a) TPA, b) EDOT ve c) EDOT-TPA (1:1) aynı şartlar uygulanarak alınan dönüşümlü voltametri grafikleri.....	23
Şekil 26.a) P(TPA) and b) P(TPA-co-EDOT) filmlerinin farklı tarama hızlarındaki CV grafikleri. c) P(TPA) ve d) P(TPA-co-EDOT) için tarama hızlarına karşı pik akımlarının değişim grafikleri.....	24
Şekil 27. P(TPA-co-EDOT) kopolimerine ait iki ve üç boyutlu spektroelektrokimya grafiği.....	25
Şekil 28. P(TPA-co-EDOT)'un uygulanan farklı potansiyellerde sahip olduğu renkler.....	26
Şekil 29. Elektrokromik cihazların şematik gösterimi.....	27

Şekil 30. P (TPA)/PEDOT cihazının spektroeletrokimyasal özellikleri ve farklı potansiyellerde oluşan renkler	28
Şekil 31. P(TPA-co-EDOT)/PEDOT elektrokromik cihazının spektroeletrokimyasal özellikleri ve farklı potansiyellerde gözlenen renkleri.....	29
Şekil 32. P(TPA)/PEDOT elektrokromik cihazı için potansiyel uygulaması ile transmittans değişimi grafiği.....	31
Şekil 33. P(TPA-co-PEDOT)/PEDOT elektrokromik cihazı için potansiyel uygulaması ile transmittans değişimi grafiği	32
Şekil 34. TDAZO'nun sentez şeması.....	33
Şekil 35. TDAZO'nun ¹ H-NMR spektrumu.....	34
Şekil 36. Dönüşümlü Voltamogramlar (a) TDAZO, (b) Politiyofen, (c) 0.1M TBAFB/AN içerisinde, Tiyofen varlığında TDAZO	35
Şekil 37. 25 °C'de 360 nm ışık uyarılması ile TDAZO'nun a) ACN ve b) DCM çözücüsü içerisindeki UV spektrumları. İç grafikler ise birinci mertebeye trans-cis izomerizasyon kinetiğini göstermektedir. c) TDAZO'nun termo duyarlılık özelliğini göstermektedir.....	37
Şekil 38. P(TDAZO-co-Th) için Spektroeletrokimya Grafiği.....	38
Şekil 39. a) P(TDAZO-co-Py)'a immobilize edilen intervaz aktivitesi üzerinde pH etkisi b) P(TDAZO-co-Py)'a immobilize edilen intervaz aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisi c) P(TDAZO-co-Py)'nin operasyonel stabilitesi.....	39
Şekil 40. 2-Hidroksi Karbazol Ferrosenil Ditiyofosfanat (Cz-Fc) Sentezi.....	40
Şekil 41. Sırasıyla, 2-Hidroksi karbazol (Cz), 2-Hidroksi karbazol ferrosenil ditiyofosfat(Cz-Fc) ve ferrosenin CV Grafikleri.....	41
Şekil 42. Cz-Fc için a) PC b) DCM c) ACN içindeki CV Grafikleri	41
Şekil 43. Cz-Fc için farklı tarama hızlarında karşılaştırılan CV Grafiği	42
Şekil 44. Cz-Fc nin UV-Vis Spektrumu.....	42
Şekil 45.P(Cz-Fc) için a) Potansiyel-Zaman c)600 nm için Absorbans-Zaman d) Akım-Zaman Grafikleri	43
Şekil 46. 1/2 ACN+1/2 BFEE içinde P(Cz-Fc) CV si.....	44
Şekil 47. BFEE içinde Cz-Fc için CV grafiği.....	44
Şekil 48. BFEE içinde CZ-Fc için farklı tarama hızlarındaki CV grafiği.....	45
Şekil 49.BFEE içinde P(Cz-Fc)'nin Spektroeletrokimya Grafiği.....	46
Şekil 50. P(Cz-Fc) için a) Potansiyel-Zaman c) 670 nm için Absorbans-Zaman d) Akım-Zaman Grafikleri	47
Şekil 51. a) BuDQP'ın ¹ H-NMR b) ¹³ C-NMR spektrumu.....	51
Şekil52. BuDQP'ın sentez şeması,koşullar: (i) K ₂ CO ₃ , ACN, reflux, 9 h, 85%; (ii) 1, NaOEt (yenihazırlanmış Na çözeltisi ve EtOH N ₂ atmosferi altında), EtOH, 0°C, dietilokzalit, 6 h, AcOH (pH~5), 75%; (iii) Br ₂ , CHCl ₃ , 45oC, 82%; (iv) EtOH, 0oC, 1 h, 82%; (v) K ₂ CO ₃ , DMF, reflux, 6 h, 88%; (vi) KOH, EtOH, 5 h, 95%; (vii) trietanolamin, 130oC, 1 h, 65%.....	52
Şekil 53. P(BuDQP) ve P(BuDQP-co-Py)'ün elektrokimyasal sentez şeması.....	53
Şekil 54. BuDQP'ın a) ACN b) PC ve c) DCM içerisindeki indirgenme ve yükseltgenme pikleri ve dönüşümlü voltametrileri.....	54
Şekil 55. a) Saf pirol ve b) P(BuDQP-co-Py)' e ait Dönüşümlü Voltamogramlar.....	55
Şekil 56. P(BuDQP) filmine ait (a) 2D ve (b) 3D spektroeletro grafikleri	55
Şekil 57. P(BuDQP-co-Py)' e ait (a) 2D ve (b) 3D spektroeletro grafikleri.....	56



Şekil 58. P(BuDQP)'nin redoks renkleri	57
Şekil 59. P(BuDQP-co-Py)'nin redoks renkleri	58
Şekil 60. Elektrokromik tepki zamanı, optic absorbans değişimi a) P(BuDQP) b) P(BuDQP-co-Py).....	58
Şekil 61. a) BuDQP'nin farklı tarama hızlarındaki CV grafikleri	59
Şekil 62. P(BuDQP-co-Py)'nin farklı tarama hızlarındaki CV grafikleri.....	60
Şekil 63. P(BuDQP)'nin redoks stabilitesi	61
Şekil 64. P(BuDQP-co-Py)'nin redoks stabilitesi	61
Şekil 65. HKCN, P(HKCN) ve P(HKCN-co-EDOT) sentez şemaları	62
Şekil 66.HKCN monomerine ait H ¹ -NMR ve C ¹³ -NMR spektrumu	63
Şekil 67. a) DCM içerisinde HKCN b) ACN içerisinde HKCN c) EDOT d)DCM içerisinde HKCN ve EDOT Dönüşümlü Voltamogramları	65
Şekil 68. P(HKCN) nin DCM/ TBP6içinde farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltammogramları. (iç grafik tarama hızına karşı pik akım değerlerini göstermektedir.)	66
Şekil 69. P(HKCN)'nin Spektroelektrokimya grafiği	67
Şekil 70. Potansiyel-zaman (a), 800 nm için geçirgenlik-zaman (b), 445 nm için geçirgenlik -zaman (c), akım-zaman (d) profilleri	68
Şekil 71. . Polimer ve kopolimerlerin spektrokimya grafikleri: a)P(HKCN) b) P(A) c) P(B) d)P(C) e)P(D) f) P(E) g) P(F) h) P(EDOT)	71
Şekil 72. HKCN kopolimerleri için monomer besleme oranına (f1) karşı kopolimer kompozisyonları (F1) grafığı.....	72
Şekil 73. P(HKCN)'nin 500mV/s tarama hızıyla art arda yapılan dönüşümlü voltametri grafikleri a) Akım-Potansiyel b) Yük-Potansiyel grafikleri.....	73
Şekil 74. Biyosensör cevabı üzerine pH'nin etkisi (50mM; sodyum fosfat tamponu; oda sıcaklığı; - 700mV hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).....	78
Şekil 75. Biyosensör cevabı üzerine biriktirme süresinin etkisi (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).	79
Şekil 76. Biyosensör cevabı üzerine hücre miktarının etkisi (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).	80
Şekil 77. . HKCN/G.oxydans biyosensörü ile glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).....	81
Şekil 78.HKCN/G.oxydans biyosensörü ile glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).....	82
Şekil 79. HKCN/G. oxydans biyosensörü için tekrarlanabilirlik denemesinde elde edilen sinyaller. (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV; 2,5mM glukoz)	83
Şekil 80. Biyosensör cevabında zamanla meydana gelen değişim grafiği. (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV).....	84
Şekil 81. Farklı substratlara ilişkin alınan biyosensör cevabı. (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).	84
Şekil 82. Diğer bileşiklerin varlığında biyosensörün glukozu verdiği cevap. (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).....	85
Şekil 83. TP-Fc sentez şeması	86

Şekil 84. TP-Fc maddesinin 1H -NMR Spektrumu.....	87
Şekil 85. TB-Fc maddesinin FTIR Spektrumu	87
Şekil 86. TP-Fc'ye ait DCM/TBFF6 içinde 250 mV/s tarama hızında alınmış Döngüsel Voltamogram ..	88
Şekil 87. TP-Fc'ye ait ACN/TBFF6 içinde 250 mV/s tarama hızında alınmış Döngüsel Voltamogram ...	89
Şekil 88.TPFc-co-Py kopolimerleştirme şeması	89
Şekil 89. P(TPFc-co-Py) (a) ve P(Py) (b) bileşiklerine ait TBFF6 içinde 250 mV/s tarama hızında alınmış Döngüsel Voltamogramlar	90
Şekil 90. P(TPFc-co-Py) (a) ve P(Py) (b) ait spektroeletrokimya grafikleri	90
Şekil 91. P(TPFc-co-Py) (a) ve Py (b) bileşiklerine ait TBFF6 içinde 250 mV/s tarama hızında alınmış Döngüsel Voltamogramlar	91
Şekil 92. a. P(TPFc-co-Py) (a) ve P(Py) (b) ait spektroeletrokimya grafikleri.....	91
Şekil 93. Biyosensör çalışmalarının şematik gösterimi.....	93
Şekil 94. TPFc-co-TPA/GOx enzim elektrodunun Lineweaver-Burk eğrisi.....	94
Şekil 95. TPFc-co-TPA/GOx biyosensörlerine pH'nın etkisi	94
Şekil 96. Elektrokimyasal immobilizasyon yöntemiyle hazırlanmış TPFc-co-TPA/GOx kalibrasyon eğrisi (Sodyum Asetat Tamponu, pH 4.5)	95
Şekil 97. Glukoz yokluğunda ve glukoz varlığında, sırasıyla, TP-Fc ; TPA ; ve TPFc-co-TPA elektrotlara ait, dönüşümlü voltagramlar	98
Şekil 98. 1,4-di(tiyofen-2-yl)bütan-1,4-dion sentezi.....	99
Şekil 99.4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1yl)anilin sentezi	99
Şekil 100. 3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1yl)anilin sentezi	100
Şekil 101.DCM/TBAPF6 içerisinde 250 mV/s tarama hızıyla alınan RF maddesine ait dönüşümlü voltametri grafiği	101
Şekil 102.DCM/TBAPF ₆ içerisinde 250 mV/s tarama hızıyla alınan RMF maddesine ait dönüşümlü voltametri grafiği.....	101
Şekil 103.P(RF) nin farklı tarama hızlarındaki CV grafiği	102
Şekil 104. P(RMF) nin farklı tarama hızlarındaki CV grafiği	103
Şekil 105. RF Maddesinin UV Spektrumu ve Redoks Renkleri.....	104
Şekil 106.RF Maddesinin UV Spektrumu ve Redoks Renkleri.....	105
Şekil 107.Karbon elektrot üzerine RF immobilizasyonun temsili gösterimi	106
Şekil 108.RMF ile hazırlanan glukozoksidaz biyosensör cevabı üzerine pH'nın etkisi (50mM; asetat tamponu; oda sıcaklığı; -700mV).....	107
Şekil 109.RF ile hazırlanan glukozoksidaz biyosensör cevabı üzerine pH'nın etkisi (50mM; asetat tamponu; oda sıcaklığı; -700mV).....	107
Şekil 110.RF ile hazırlanan glukozoksidaz biyosensörünün değişen glukoz konsantrasyonlarındaki akım değerleri (Sodyum asetat tamponu; pH 4,5; 50 mM; oda sıcaklığı; -0.7 mV)	108
Şekil 111.RMF ile hazırlanan glukozoksidaz biyosensörünün değişen glukoz konsantrasyonlarındaki akım değerleri (Sodyum asetat tamponu; pH 4,5; 50 mM; oda sıcaklığı; -0.7 mV)	108
Şekil 112. RF ile hazırlanan glukozoksidaz biyosensörünün değişen glukoz konsantrasyonlarındaki akım değerleri (Sodyum asetat tamponu; pH 4,5; 50 mM; oda sıcaklığı; -0.7 mV.....	109
Şekil 113. 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1yl)anilin sentezi	110
Şekil 114. 4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)amido ferrosenil ditiyofosfanat sentezi	111
Şekil 115. RF-Fc Maddesinin 1H-NMR Spektrumu	112



Şekil 116. RF-Fc ile EDOT kopolimerizasyonu.....	112
Şekil 117.DCM/TBAPF6 içerisinde 250 mV/s tarama hızıyla alınan RF (a), RF-Fc (b) ve ferrosene (c) ait dönüşümlü voltametri grafikleri.....	113
Şekil 118.a) RF-Fc b) EDOT c) A d) B e) C f) D' ye ait Dönüşümlü Voltametri grafikleri.....	115
Şekil 119.P(RF-Fc) nin farklı tarama hızlarındaki CV grafiği.....	116
Şekil 120.P(RF-Fc-co-EDOT) un farklı tarama hızlarındaki CV grafiği.....	116
Şekil 121. P(RF-Fc)nin Spektroelektrokimya Grafiği ve Redoks Renkleri.....	117
Şekil 122. A karışımından sentezlenen kopolimere ait spektroelektrokimya grafiği ve redoks renkleri.....	118
Şekil 123. B karışımdan sentezlenen kopolimere ait spektroelektrokimya grafiği ve redoks renkleri.....	118
Şekil 124. C karışımdan sentezlenen kopolimere ait spektroelektrokimya grafiği ve redoks renkleri.....	119
Şekil 125. D karışımdan sentezlenen kopolimere ait spektroelektrokimya grafiği ve redoks renkleri.....	120
Şekil 126.P(EDOT)un Spektroelektrokimya Grafiği.....	121
Şekil 127. P(RF-Fc-co-EDOT) kopolimerleri için monomer besleme oranına (f1) karşı kopolimer kompozisyonları (F1) grafiği.....	123
Şekil 128. P(RF-Fc-co-EDOT)' un 1.0 V sabit potansiyeldeki spektroelektrokimyası.....	124
Şekil 129. P(RF-Fc-co-EDOT) D karışımının 1.3 V sabit potansiyeldeki spektroelektrokimyası.....	125
Şekil 130. P(RF-Fc-co-EDOT) D karışımının 1.5 V sabit potansiyeldeki spektroelektrokimyası.....	126
Şekil 131. P(RF-Fc) için a) Potansiyel-Zaman b)700 nm için Absorbans-Zaman c) 430 nm için Absorbans-Zaman d) Akım-Zaman Grafikleri.....	128
Şekil 132. P(RF-Fc-co-EDOT) için a) Potansiyel-Zaman b)1000 nm için Absorbans-Zaman c) 550 nm için Absorbans-Zaman d) Akım-Zaman Grafikleri.....	129
Şekil 133. a) A b) B c) C d) D Karışımlarının In-situ polimerizasyonları.....	130
Şekil 134. Biyosensör cevabı üzerine biriktirme süresinin etkisi (Sodyum asetat tamponu; pH 4,5; 50 mM; oda sıcaklığı -0.7 mV; RF/RFFc (mg/mg monomer miktarı) oranları için 1: 1 mg/4 mg; 2: 2 mg/3 mg; 3: 0,5 mg/4,5 mg; 4: 5 mg/5mg)......	131
Şekil 135. Biyosensör cevabı üzerine pH'nın etkisi (50mM; asetat tamponu; oda sıcaklığı; -700mV).....	132
Şekil 136. Glukoz oksidaz biyosensörlerinin değişen glukoz konsantrasyonlarındaki akım değerleri (Sodyum asetat tamponu; pH 4,5; 50 mM; oda sıcaklığı; -0.7 mV).....	133



Tablo Listesi

Tablo 1. Polimerlerin iletkenlikleri	26
Tablo 2. Polimer ve cihazların elektronik ve elektrokromik özellikleri.....	30
Tablo 3. Serbest ve immobilize edilmiş invetazın kinetic parametreleri.....	38
Tablo 4. Benzer SNS türevleri için spektroeletrokimyasal veriler.....	67
Tablo 5. Farklı besleme oranı içeren monomer çözeltilerinin elektrokimyasal polimerleştirilmesi ile oluşan kopolimerlerin özellikleri	70
Tablo 6. Referans metot prosedürü	77
Tablo 7. Örnek uygulama sonucu	85
Tablo 8. TPFC-co-TPBA/GOx ve spektrofotometrik yöntem kullanılarak iki farklı örnekte glukoz analizi	96
Tablo 9. Etanol ve 3-asetamido fenol bileşiklerinin TP-Fc-co-TPBA/GOx ait biyosensör cevabına etkisi	97
Tablo 10. RF glikoz biyosensörünün örnek uygulaması.....	110
Tablo 11. Kopolimer Karışım Oranları	112
Tablo 12. RF, RF-Fc ve Fc nin indirgenme yükseltgenme potansiyelleri.....	114
Tablo 13. Farklı besleme oranı içeren monomer çözeltilerinin elektrokimyasal polimerleştirilmesi ile oluşan kopolimerlerin özellikleri	122
Tablo 14. Polimerleştirme potansiyelinin kopolimerleşmeye etkisi	126
Tablo 15. Glukoz oksidaz biyosensörleri ve spektrofotometrik yöntem kullanılarak iki farklı örnekte glukoz analizi.	134



ÖZET

İletken polimerler elektriksel etkilerle kimyasal, elektriksel, optik ve mekanik özelliklerinde değişime uğrarlar. İnorganik bileşenlerin iletken organik polimerler yapılarına dahil edilmesilmeyle oluşturulan hibrit malzemeler biyoteknoloji, kataliz, elektronik gibi alanlarda umut verici uygulamalar vaatmektedir.

Bu çalışmada, ferrosenilditiyadifosfetan 'ın amino ve hidroksil grubu içeren tiyofen ve pirol gibi elektroaktif bileşiklerle toluenli ortamda etkileştirilmesi sonucu yeni elektroaktif ditiyofosfor bileşikleri sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Hem organik hem de inorganik grup içeren bu monomerlerin uygun çözücü ve destek elektrolit varlığında elektrokimyasal olarak polimerleştirilmesiyle oluşturulan hibrit polimerlerin karakterizasyonu yapılarak, elektrokromik ve elektrokimyasal biyosensör uygulamaları araştırılmıştır.



ABSTRACT

The application of electrical stimuli can result in drastic changes in the chemical, electrical, optical and mechanical properties of conducting polymers. Incorporation of inorganic components in the organic conducting polymeric structure have shown promising applications in various fields of chemistry such as organic synthesis, biotechnology, catalysis, electronics etc.

In this work, new electroactive dithiaphosphorus compounds have been synthesized by reaction between Ferrocenyldithiadiphosphotane and thiophene and pyrrole derivatives with amino or hydroxyl groups in toluene. Electrochromic and electrochemical biosensor applications of hybrid polymers formed by electrochemical polymerization of the monomers containing both organic and inorganic groups have been investigated.

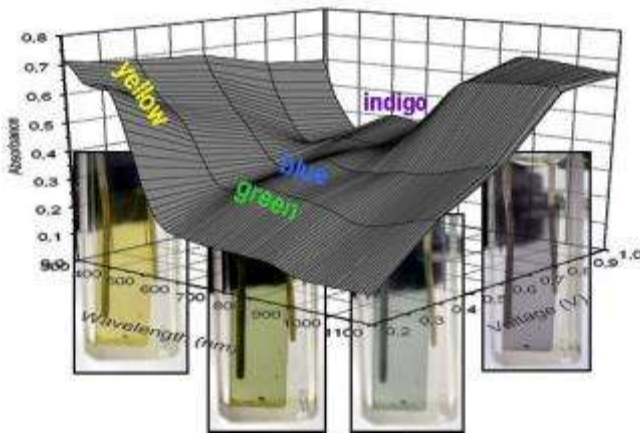
1. GİRİŞ

1.1 Elektrokromik Malzemeler

İletken polimerler son 30 yılda, bu polimerlerin elektrokromik özellikleri ise son 10 yılda ciddi anlamda hem bilim hem de ticari çevrelerin ilgisini çekmiştir. Bu durum iletken polimerlerin biyosensörler (Vidal, Ruiz ve Castillo 2003), alan etkin transistörler (Horovitz 1998), güneş pilleri (Cravino ve Sariciftci 2002), ışık saçan diyotlar (Burroughes, et al. 1990) ve elektrokromik cihazlar (Sommani ve Radhakrishnan 2002) gibi uygulama alanlarının bulunması ve bunlardan özellikle son ikisinin plastik ekran yapımında kullanılabilecek nitelikte olmasından kaynaklanmaktadır. Son dönemde elektrokromik uygulamalara yönelik olarak yapılan incelemeler, akademik çevrelerce önem verilen birçok dergide kapak çalışması olarak sunulmuş ve pek çok patent alınmıştır.

Elektrokromizm, malzemenin tersinir olarak elektrokimyasal yöntem ile oksitlendiğinde (elektron kaybı) veya indirgenildiğinde (elektron kazanımı) optik özelliklerinde değişim gözlenmesi olarak tanımlanabilir.

İletken polimerler kullanılarak üretilen elektrokromik malzemeler, kimyasal, elektrokimyasal veya basit kaplama teknikleri kullanılarak üretilebilir. Bu malzemelerin işlenebilirliği daha yüksek, maliyeti ise daha düşüktür. İletken polimerlerde renkler katkılama yüzdesine, seçilen monomere, uygulanan potansiyele göre değişir. Bu yüzden iletken polimerler kullanılarak çok daha fazla sayıda renk ve daha yüksek kontrast elde etmek mümkündür (Şekil 1).(Turkaslan, et al. 2007)(Varis, et al. 2007)(Ak, et al. 2008)



Şekil 1. İletken polimerlerin uygulanan farklı potansiyellerdeki renkleri ve absorpsiyon spektrumları.



Biyosensörler, biyolojik sistemler ve bu sistemlerden gelen bilgiyi analitik olarak kullanışlı bir sinyale dönüştüren iletici sistemlerden meydana gelir. Spesifik bir analit ya da analitler grubunun konsantrasyonuna bağlı olarak sinyal oluşturur. Biyosensörlerin biyolojik bileşeni; katalitik özellik taşıyan ve katalitik özellik taşımayan biyomateryaller olarak iki önemli gruba ayrılır. Katalitik özellikteki grup enzim, mikroorganizma ve dokuları içerirken, katalitik özellik göstermeyen grup ise antikorlar, reseptörler ve nükleik asitlerden oluşur. (Sharma, et al. 2004) Biyosensörlerin, analit tayini için gerekli olan iletici kısmı ise elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik), optik, termometrik, piezoelektrik ya da manyetik özellikteki gruplardan oluşabilir (Sharma, et al. 2004) (Velasco-Garcia ve Mottram 2003). Biyolojik sistem ve iletici sistemin iyi bir şekilde etkileşmesi yani başarılı bir immobilizasyon tekniğinin kullanılması etkili bir biyosensörün hazırlanmasında önemlidir (Tkac, et al. 2005).

Son zamanlarda, organik bileşiklerin tayini için birçok biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Bunların büyük bir kısmı enzim katalizli ya da mikrobiyal katalizli reaksiyonları temel almaktadır. Enzim ile modifiye edilmiş elektrotlar amperometrik biyosensörlerin ve biyoyakıt hücrelerinin temel parçalarındandır. Enzim elektrotları elektrokimyasal prosesi immobilize enzimin aktivitesi ile kombine eden minyatür kimyasal iletici sistemlerdir (Dzyadevych, et al. 2008). Bu sistemler enzimin biyolojik fonksiyonu sayesinde biyolojik orijinli olan substrat moleküllerine karşı genellikle yüksek seçicilik gösterir. Bu nedenle, enzimlerin sahip olduğu bu özellik enzim sensörleri oluşturulmasında avantaj sağlar. Enzim sensörleri ilgili substratlarına karşı yüksek spesifiklik gösterir, ancak enzimler genelde pahalıdır ve stabil değildir. Mikrobiyal biyosensörler biyokimyasal proseslerin on-line kontrolü için uygundur ve birçok araştırmacı için çalışma konusu olmuştur (Karube ve Nakanishi 1994).

Birbirinden çok farklı özelliklere sahip iki yapı taşının birleştirilmesiyle oluşturulan inorganik-organik hibrit polimerik malzemeler üzerine çok farklı bilim dallarında araştırmalar yapılmaktadır. Organik polimerik yapıya inorganik bileşenlerin dahil edilmesiyle oluşturulan bu hibrit malzemeler üzerinde özellikle organik sentez, kataliz, elektronik gibi alanlarda teknolojik uygulamalar için araştırmalar yapılmaktadır (Kickelbick 2003)(Beleze, Fabio and Zarbin ve Aldo 2001).

Projede literatürde benzer türevleri bulunmayan, tiyofen, pirol gibi elektrokimyasal ve kimyasal yollar ile polimerleştirilen grup içeren ve inorganik ferrosenil ditiyofosfonat ile fonksiyonlandırılmış hibrit monomerlerin ve polimerlerin sentezlenecektir. Monomer tasarımı polimerleşebilir ünite ve inorganik redoks aktif grubun etkin ve kolay bir biçimde birleştirilmesi

esasına dayanmaktadır. Elde edilen polimerler elektrokromik özellikleri yanında biyosensör olabilmeye kapasiteleri ölçülecektir.

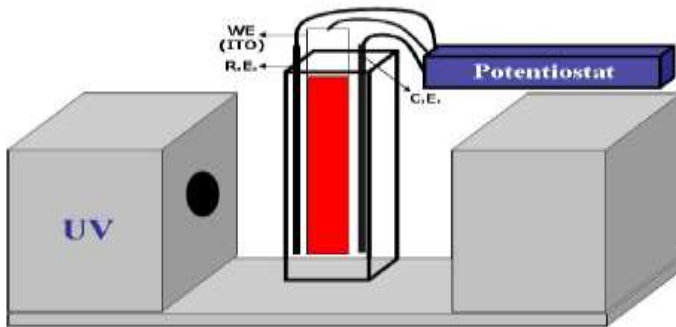
1.2 Döngülü Voltametre

Döngülü voltametre elektroaktif maddelerin elektrokimyasal davranışlarını araştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle çalışma elektrotunun potansiyeli referans elektrotuna göre taranırken, çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında meydana gelen akım ölçülmektedir. Sonuç olarak elde edilen voltamogram akıma karşı potansiyeli göstermekte ve ilgili maddenin elektroaktivitesi ve redoks davranımı hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca bu yöntem elektrokimyasal tepkimenin mekanizması, tersinir olup olmadığı ve oluşan ürünün iletken olup olmadığı hakkında da bilgi vermektedir.

Elektrokimyasal polimerizasyon sonucunda elde edilen polimer ile kaplanmış elektrot monomer çözeltisinden çıkarılır ve tepkimeye girmemiş monomerlerden kurtulmak için uygun bir çözücü ile yıkanır ve monomersiz ortamda polimer filminin redoks davranımı incelenir. Bu çalışmada döngülü voltametre ve elektroliz deneyleri Gamry Referans 600 potentiostat-galvanostat cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

1.3 Spektroelektrokimyasal Ölçümler

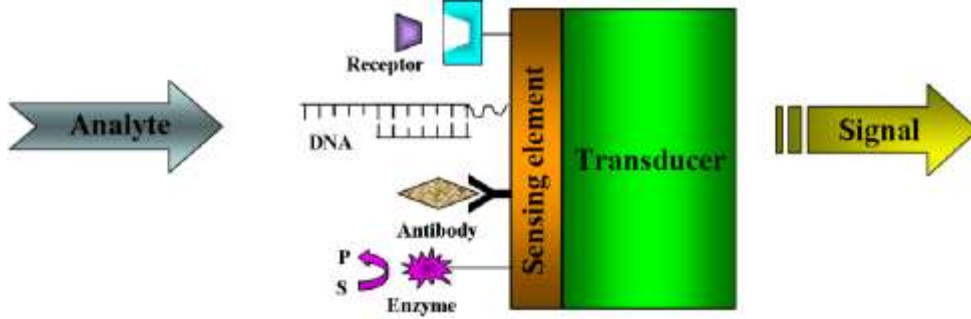
İletken polimerlerin spektroelektrokimyasal ölçümleri bant aralıkları, doplama sırasında oluşan bant değişiklikleri ve elektrokromik özellikleri hakkında bilgi verir. Spektroelektrokimyasal çalışmalarda, platin tel, karşıt elektrot ve Ag tel, referans elektrot olmak üzere ITO çalışma elektrotu kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmalarda Agilent 8453 UV-visible diode array spektrofotometre cihazı Gamry Referans 600 model potentiostat cihazı ile birlikte kullanılmıştır. Potentiostat cihazı ile farklı potansiyel uygulanan iletken polimerin uygulanan her potansiyel değeri için UV spektrumu alınmıştır (Şekil 3).



Şekil 2. Spektroelektrokimyasal denemelerin yapıldığı düzenek

1.4 Biyosensörler

Biyosensörler, analit konsantrasyonu ile orantılı ölçülebilir bir sinyal oluşturmak için, bir biyolojik tanıyıcı ve bir fiziksel iletici sistemi birleştiren analitik cihazlardır. Bir biyosensörün genel prensibinde, biyolojik tanıyıcı hedef bileşiğe yanıt verir ve iletici sistem biyolojik cevabı, elektrokimyasal, optik, akustik, mekanik, kalorimetrik ve elektronik olarak ölçülebilen ve analit konsantrasyonu ile ilişkilendirilebilen bir sinyale çevirir (Liang, et al. 2011).



Şekil 3. Bir biyosensörün şematik gösterimi

Şekil 3'de gösterildiği gibi bir biyosensör bir biyoelement (sensör elementi) ve bir iletici sistemden oluşur. Biyoelement enzim, antikor, canlı hücre ya da doku olabilir. Ölçüm elementi ise elektrik akımı, elektrik potansiyeli olabilir. Farklı biyoelement ve sensör elementlerinin bir listesi şekil 4'de gösterilmektedir (Mohanty ve Koungianos 2006).



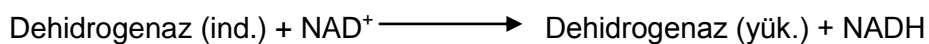
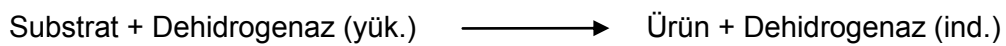
Şekil 4. Biyosensör elementleri

1.4.1 Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri

Amperometrik Esaslı Enzim Sensörleri

Amperometri en genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen yada indirgenen elektro aktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrod referans elektrod olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanır (Dinçkaya 1999).

Oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen dehidrogenaz enzimleri monoenzimatik sistemlerde amperometrik enzim elektrodunda kullanılan genel enzimlerdir.





Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri

Elektrokimyasal esaslı enzim sensörlerinin ikinci önemli grubunu potansiyometrik enzim elektrodları oluşturmaktadır. Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda çalışma ve referans elektrod arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrod potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Elde edilen sinyal Nerst Kanunu uyarınca konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik enzim elektrodlarında kullanılan temel sensörler pH yada tek değerlikli iyonlara duyar cam elektrodlar, anyon yada katyonlara duyar iyon seçimli elektrodlar ve karbondioksit yada amonyağa yönelik gaz duyar elektrodlardır. Potansiyometrik esaslı enzim elektrodları söz konusu sensörler üzerine bir veya birden çok enzimin uygun immobilizasyon yöntemleriyle genelde pratik metodlarla monte edilmesiyle hazırlanır (Mohanty ve Kougiyanos 2006).

Yarı İletken Esaslı Enzim Sensörleri

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etkili transistörleri yada iyon duyar alan etkin transistörleri esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etkin transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etkili transistörü olarak adlandırılır (Mohanty ve Kougiyanos 2006).

İletken polimerler uygun enzim matriksleri olmaları nedeniyle büyük ilgi çekmektedir. Diagnostikte iletken polimerler; vital analitleri ölçmek için biyosensörlerin hızını ve duyarlılığını arttırmak için kullanılır (Gerard, Chaubey ve Malhotra tarih yok). Fiziksel adsorbsiyon, elektrokimyasal tutuklama ve kovalent bağlama gibi birçok teknik iletken polimerlerle biyomolekül immobilizasyonu için kullanılmıştır. Biyomoleküllerle iletken polimerlerin inkorporasyonu için kullanılan teknikler elektrot yüzeyinde istenilen boyutta ya da geometride biyolojik olarak aktif olan molekülün lokalizasyonuna imkan sağlarlar (Malhotra, Chaubey ve Sings 2006).

Bu nedenle çeşitli biyo(analitik) ve teknolojik uygulamaları vardır. İletken polimerler, kolay sentezlenirler ve monomer çözeltisinden elektrokimyasal polimerizasyon ile iletken yüzeyinin üzerine biriktirilebilirler. Ayrıca oluşum hızları ve kalınlıkları elektrokimyasal olarak kontrol edilebilir (Vidal, Ruiz ve Castillo 2003).

2. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar

Kullanılan bütün kimyasallar Aldrich Chemical ve Alfa Easer firmasından satın alınmıştır. Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan asetonitril (AN) ve diklorometan (DCM) çözücülerini kullanılmadan önce distillenmiştir. Redoks ve elektrokromik özelliklerin incelenmesi deneylerinde çalışma ve karşıt elektrot olarak sırasıyla platin ve indiyum tin oksit (ITO, Delta Tech. 8–12 Ω , 0.7 cm x 5 cm) kaplı cam elektrot kullanılmıştır. Referans elektrot olarak ise gümüş tel (R=1mm) kullanılmıştır. Polimer filmleri çoklu döngü veya sabit potansiyel elektroliz yöntemleriyle hazırlanmıştır. Sentezlenen monomerler Argon atmosferi altında buzdolabında muhafaza edilmiştir. Elektrokromik özelliklerin incelenmesinde platin karşıt elektrot, Ag/Ag⁺ referans ve camsı karbon elektrot ise çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır.

2.1 Araç ve Gereçler

2.1.1 Proje Bütçesinden Satın Alınan Teçhizatlar

Proje bütçesinden aşağıda fotoğrafları verilen iki adet makine teçhizat alınmıştır. Bunlardan birincisi elektrokimyasal tüm deneylerin gerçekleştirileceği Gamry Referans 600 potentiostat-galvanostat cihazı diğeri ise özellikle kinetik ve spektroeletrokimyasal çalışmaların yapılacağı Agilent 8453 UV-visible diode array spektrofotometredir (Şekil 2).



a)



b)

Şekil 5.a. Gamry Referans 600 potentiostat-galvanostat cihazı b. Agilent 8453 UV-visible diode array spektrofotometre

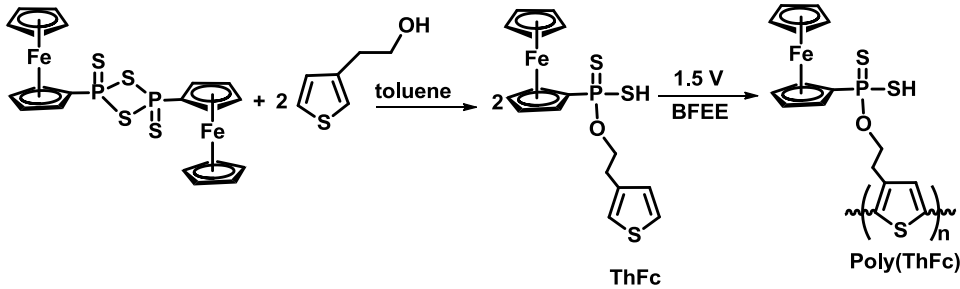
3. Tüm Maddelerin Sentez Şemaları ve Elektrokromik Özellikleri

Bu bölümde sentezlenen malzemelerin sentez prosedürleri, bu malzemelerin incelenen elektrokromik ve biyosensör özellikleri özetlenecektir.

3.1 O-2-(tiyofen-3-yl)etil ferrosenil ditiyofosfonat (ThFc)

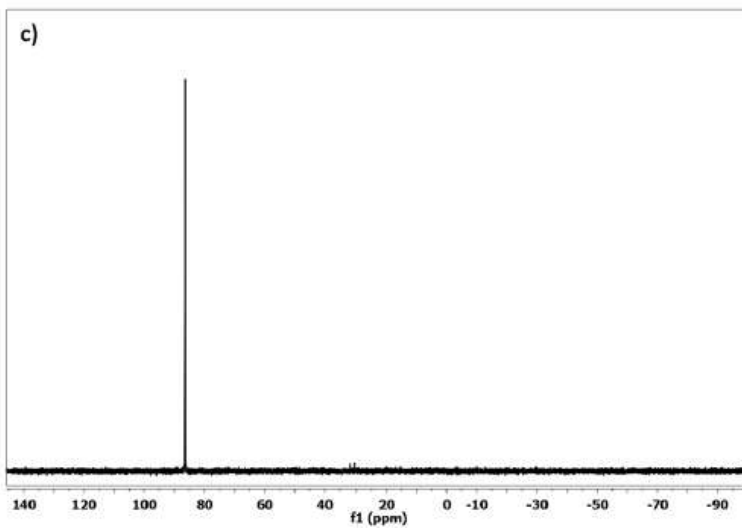
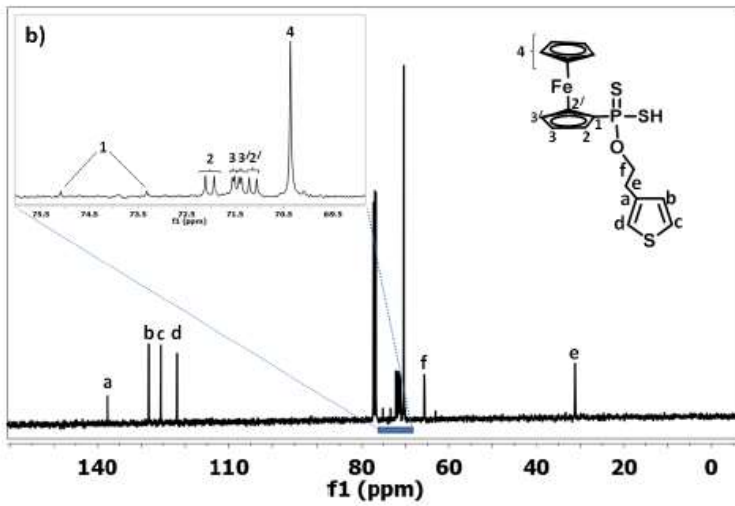
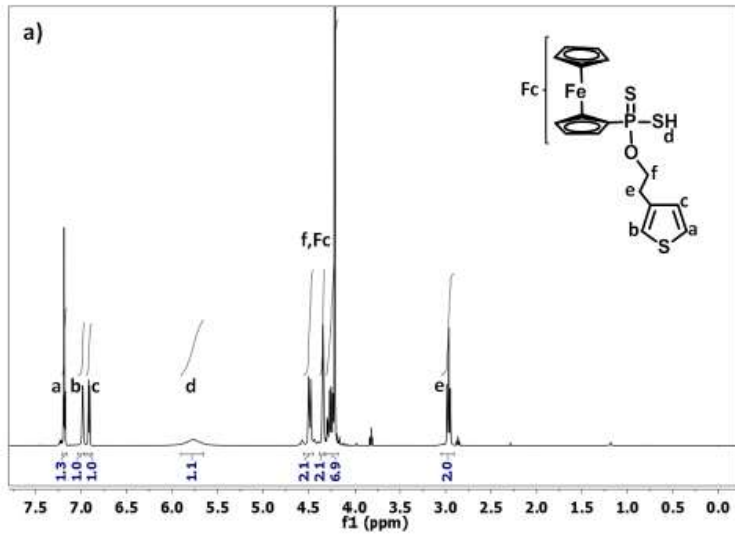
3.1.1 ThFc' nin Sentezi

ThFc, $[\text{FcP}(=\text{S})(\mu\text{-S})]_2$ ile 2-(3-tiyoenil) etanolün toluen içindeki reaksiyonu ile sentezlenmiştir (Şekil 4). Detaylı sentez bilgileri şu şekildedir. 0,50 g (0,89 mmol) $[\text{FcP}(=\text{S})(\text{m-S})]_2$ 25 ml toluen içerisinde 0,23 g (1,78 mmol) 2-(3-tiyoenil) etanol ile (1:2 mol oranında) reaksiyona sokulmuş böylece O-2-(tiyofen-3-yl)etil-ferrosenilditiyofosfonat bileşiği elde edilmiştir. Reaksiyon karışımı tüm katı bileşenler çözülüp kahverengi bir çözelti elde edilinceye kadar ısıtılmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımı süzülmüş ve çözelti -18°C 'de soğumaya bırakılmıştır. Sarı-turuncu renkli kristal süzülmüş ve vakumda kurutulmuştur. 0,42 g (% 58 verimle) ürün elde edilmiştir (erime noktası $47-4^\circ\text{C}$ 'dir). Bileşik ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{FeOPS}_3$) için analitik olarak hesaplanan C, H %'si %47,06 C, %4,19 H şeklindedir, deneysel olarak bulunan yüzdeler teorik değerler ile oldukça uyumlu olup %47,01 C ve %4,27 H şeklindedir. Bileşiğin $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) verileri δ : 7.23(m, 1H, CH), 7.04(m, 1H, CH), 6.97(dd, 1H, CH), 4.51(m, 2H, C_5H_4), 4.39(m, 2H, C_5H_4), 4.19(s, 5H, C_5H_5), 3.04(t, 2H, CH_2), 2.06(br, 2H, CH_2) şeklinde $\text{IR}(\text{cm}^{-1})$ verileri ise 655 ($\nu_{\text{asym}} \text{PS}_2$) and 589 ($\nu_{\text{sym}} \text{PS}_2$) şeklindedir.



Şekil 6. ThFc ve P(ThFc) sentez şeması

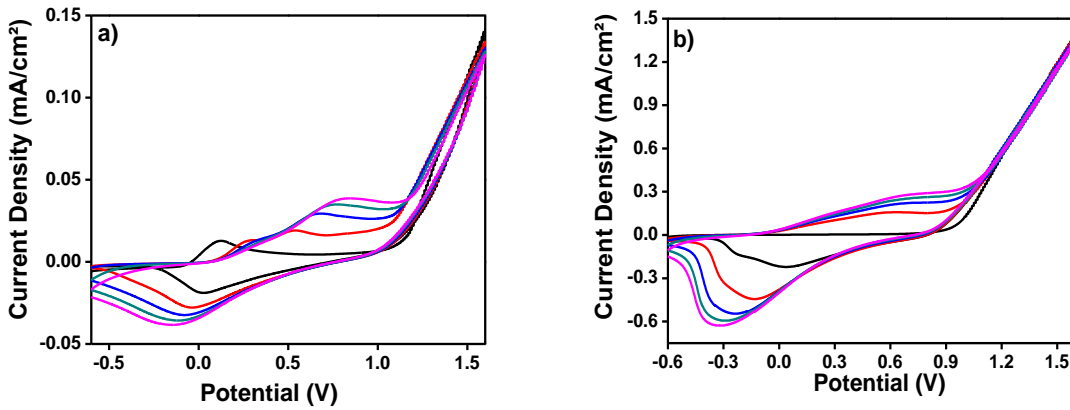
Sentezlenen ThFc ve ThFc-Ni $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve $^{31}\text{P-NMR}$ spektrumları ile karakterize edilmiştir. ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları için referans olarak TMS kullanılmıştır. ^{31}P NMR spektrumu için ise ($\delta = 0$) ortofosforik asit (H_3PO_4) kullanılmıştır.



Şekil 7. ThFc' nin ^1H -NMR (a), ^{13}C -NMR (b) ve ^{31}P -NMR (c) spektrumu

3.1.2 ThFc' nin Redoks özellikleri ve Polimerleştirilmesi

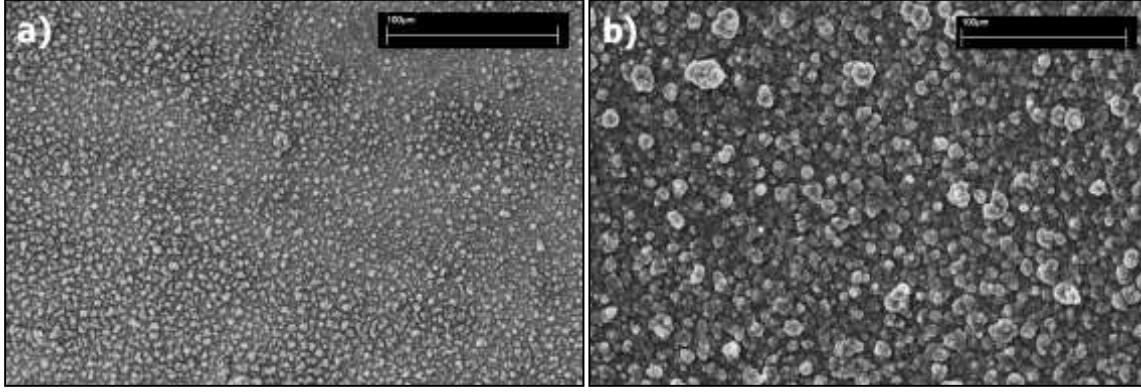
ThFc polimerleştirilmesinde birçok çözücü ve destek elektrolit çifti denenmiş fakat polimerleştirilememiştir. Polimerleşme sadece Bortriflorid:dietileter kompleksi (BFEE) içerisinde ve ilave destek elektrolit kullanılmadan gerçekleştirilebilmiştir. BFEE; ThFc'nin polimerleştirilmesinde hem çözücü hem de destek elektrolit görevini üstlenmiştir. ThFc bileşiğinin -0,6:+1,6V potansiyel aralığında, 200 mV/s tarama hızında alınmış döngülü voltamogramı Şekil 6.a' da verilmiştir. İlk döngüde ferrosenin oksidasyonuna ait olan ve 0,12 V' ta gözlenen pik ikinci döngüde monomerin polimerizasyonundan dolayı 0,27 V'a kaymıştır. Takip eden döngülerde ferrosenin oksidasyon piki, polimere ait oksidasyon pikinin altında kalmıştır. İndirgenme piki -0,08 V'ta gözlenmiştir. Şekil 6.b de karşılaştırma amaçlı aynı koşullarda çekilmiş tiyofen CV si verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi politiyofene ait oksidasyon piki geniş bir aralıkta gözlenmekte (0,0-1,1 V) ve indirgenme piki -0,3 V olarak belirlenmektedir.



Şekil 8. ThFc (a) ve Th (b) bileşiklerine ait BFEE içinde 200 mV/s tarama hızında alınmış Döngüsel Voltamogramlar

3.1.3 ThFc' nin Yüzey özellikleri

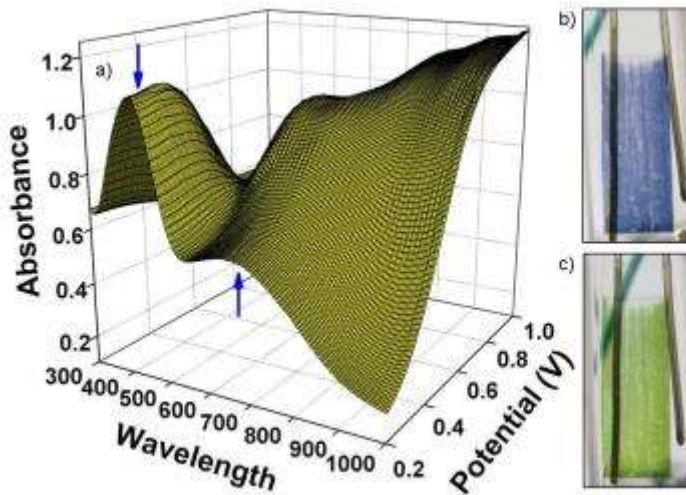
Polimerin yüzey özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Her iki polimerde BFEE içerisinde destek elektrolit kullanılmaksızın sentezlenmiştir. Aynı ana zincire sahip oldukları için P(ThFc) (Şekil 7a) ve PTh (Şekil 7b) SEM görüntüleri benzerdir. SEM görüntülerinden P(ThFc)'nin P(Th)'ye oranla daha pürüzsüz bir yapıya sahip olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 9. P(ThFc) (a) ve P(Th) (b) bileşiklerine ait SEM görüntüleri

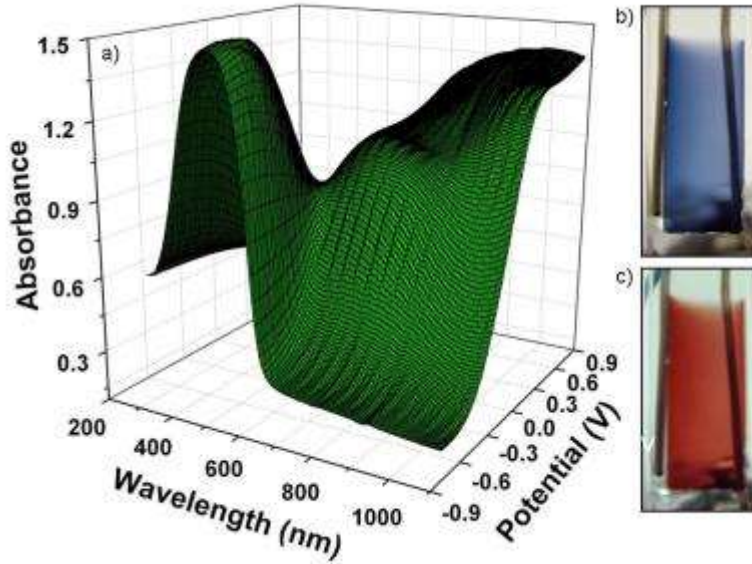
3.1.4 P(ThFc)' nin spektroelektrokimyasal özellikleri

Spektroelektrokimya deneyleri için P(ThFc) sabit 1,5 V potansiyel altında ITO elektrot üzerinde film halinde kaplanarak sentezlenmiştir. Spektroelektrokimya deneyleri monomer içermeyen BFEE çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. P(ThFc)'nin politiyofen anazincirine ait 320-600 nm aralığında (417 nm'de maksimum ile) absorpsiyonuna ek olarak, ferrosen gruplarının boron triflorür dietil eterat (BFEE) grubu ile etkileşiminden kaynaklanan 600-800 nm aralığında bir absorpsiyon gözlenmiştir. Spektroelektrokimya çalışmaları P(ThFc)'nin π^* elektronik geçişinden kaynaklanan 2,14 eV büyüklüğünde band boşluğu enerjisi olduğunu göstermektedir (Şekil 10).



Şekil 10. P(ThFc)' nin spektroelektrokimya deneyi sonucunda elde edilen grafiği (a) ve P(ThFc)'nin BFEE içindeki redoks renkleri: (b) yeşil renk 0,0 V'ta (L:71, a:-27, b:52), (c) Mavi renk +1,2 V'ta (L:47, a:3, b:-30).

Rengin tam olarak ölçümünü sağlayan kolorimetre (Renk ölçümü) elektrokromik polimerler için önemli bir teknik haline gelmiştir. Kolorimetre ölçümleri için Minolta CS-100 markalı spektrofotometre kullanılmıştır. P(ThFc) nötral ve yükseltgenmiş halleri için sırasıyla yeşil ve mavi renklerine sahiptir. P(ThFc)'nin reox renklerine karşılık gelen L^*a^*b değerleri şekil 10b-c'de verilmiştir (Aynı koşullar ile sentezlemiş P(Th)'e ait renkler şekil 10b-c'de verilmiştir).

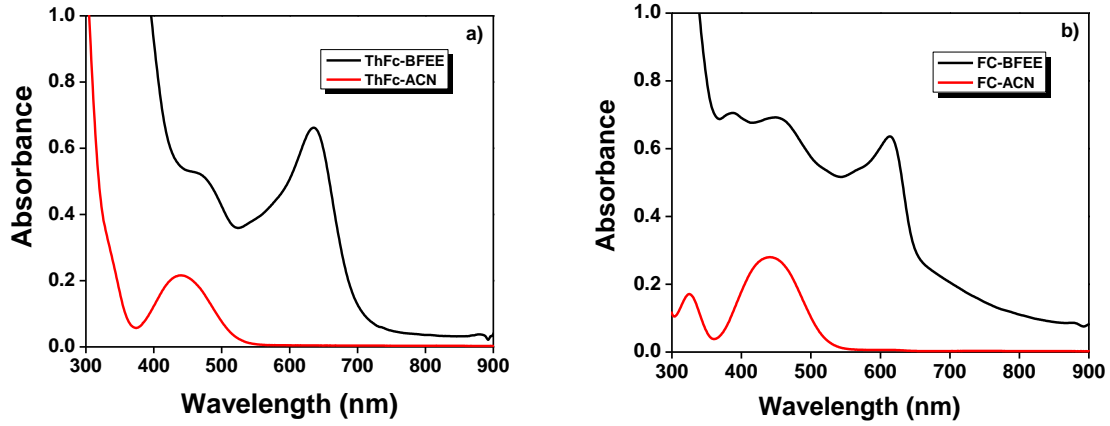


Şekil 11. P(Th)'nin spektroelektrokimya deneyi sonucunda elde edilen grafiği (a) ve P(Th)'nin BFEE içindeki redoks renkleri: (b) kırmızı renk -0,8 V'ta ($L:42, a:36, b:31$), (c) Mavi renk +0,8 V'ta ($L:46, a:3, b:-26$).

Polimerizasyon çözücü sisteminin araştırılması çalışmalarında; ferrosen grubu ile hem çözücü hemde destek elektrolit görevi yapan BFEE arasında kalıcı bir etkileşimin olduğu fark edilmiştir. Bu etkileşim sonucunda 600-800 nm arasında ilave bir absorpsiyon gözlenmiştir. Dolayısıyla politiyofen anazincirinin 370 nm deki absorpsiyonuna ek olarak 600-800 nm arasındaki ferrosen-BFEE etkileşimi absorpsiyonu sebebiyle P(ThFc) nötral halde yeşil renktedir. Bilindiği gibi aynı yapıda iki farklı absorpsiyonun gerekmesi sebebiyle nötral halde yeşil renkli polimer elde etmek oldukça zordur. Literatürde nötral halde mavi ve kırmızı renkli birçok polimerin bulunmasına rağmen ana renklerin üçüncü ayağı olan yeşil renkli polimer oldukça sınırlıdır.

ThFc'nin Asetonitril (ACN) ve BFEE çözücüleri içindeki UV spektrumları Şekil 10.a'da verilmiştir. ThFc'nin BFEE çözücüsü içerisinde alınmış spektrumunda 650 nm'de BFEE-ThFc

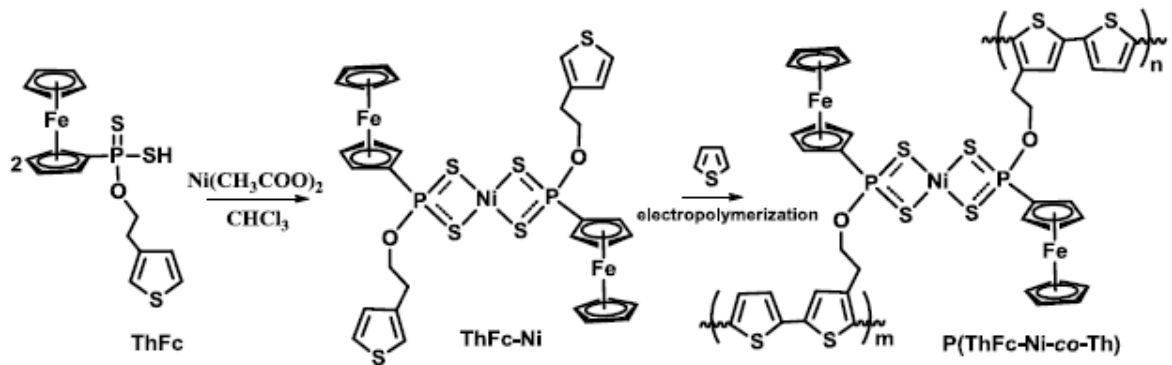
etkileşiminden kaynaklanan pik gözlenirken aynı pik ACN içinde alınan spektrumda gözlenmemiştir. Benzer absorpsiyon ferrosenin BFEE içinde alınmış UV spektrumunda da gözlenmektedir (Şekil 10b). BFEE-ferrosen arasındaki etkileşim kalıcı olup çözücünün sonradan uzaklaştırılması ya da değiştirilmesi durumlarında da devam etmektedir. Bu etkileşim üzerinde daha detaylı incelemelerin yapılması gerekmektedir.



Şekil 12. ThFc (a) ve ferrosenin (b) asetonitril (ACN) ve BFEE çözücülerindeki UV spektrumları

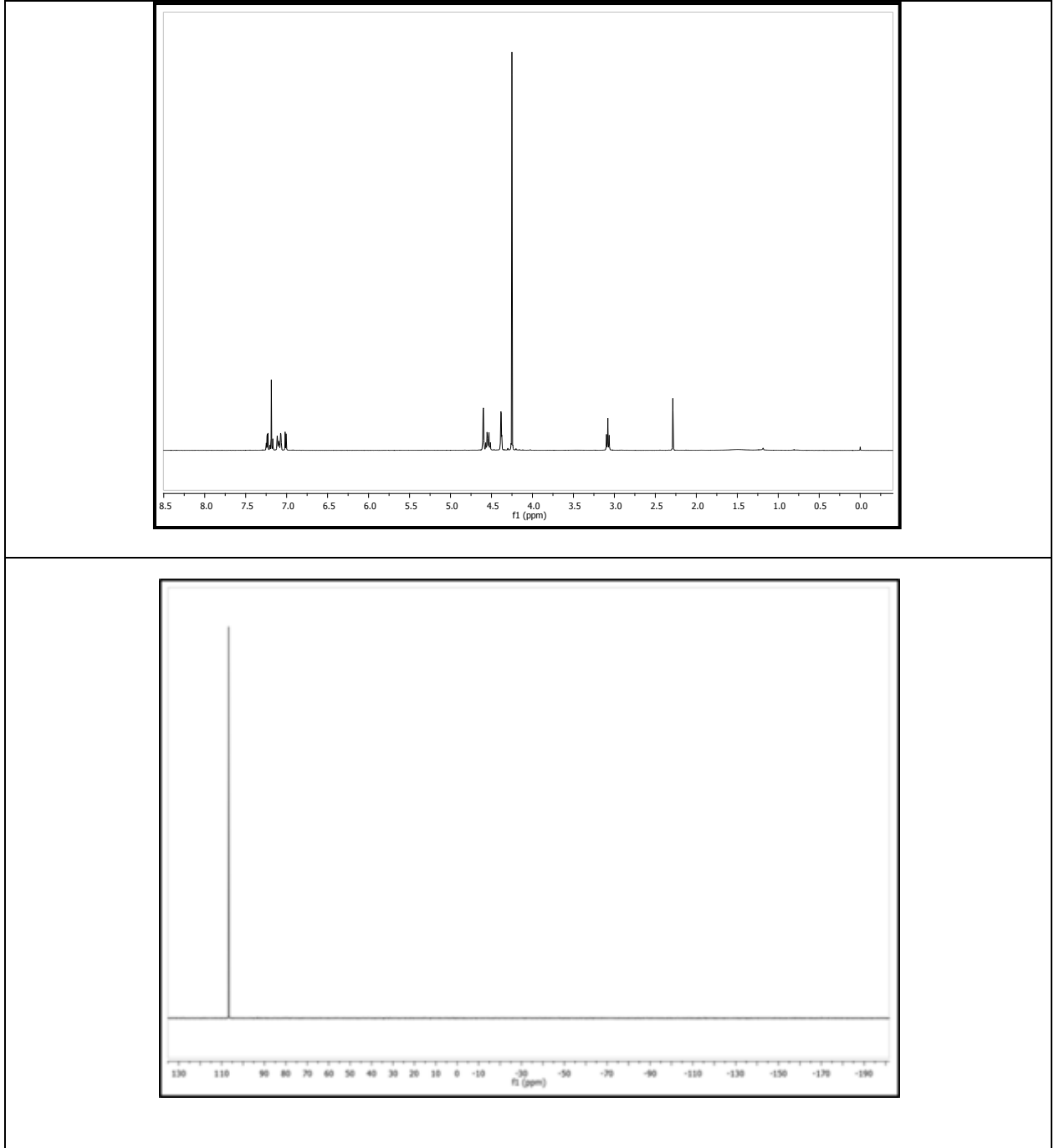
3.1.5 O-2-(thiophen-3-yl)ethyl ferrocenyl dithiophosfonat'ın (ThFc) Nikel Kompleksinin(ThFc-Ni) Sentezi

CH₃COOH (5 mL) içerisinde hazırlanmış Nikel(II)asetat (0.07g, 0.4 mmol) çözeltisi, CHCl₃ içerisinde hazırlanan O-2-(tiyofen-3-il)etil-4 ferrosenilditiyafosfanat (0.42g, 0.8 mmol) çözeltisi içerisinde eklenmiş ve 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Kahverengi bir çözelti elde edilmiştir. Birkaç gün sonra kahverengi kristaller filtrasyon ile izole edilmiş ve *n*-hekzan ile yıkanıp, kurutulmuştur. Hesaplamalar sonucu %48 verimle ürün elde edilmiştir.



Şekil 13. THFc-Ni kompleksinin sentez şeması

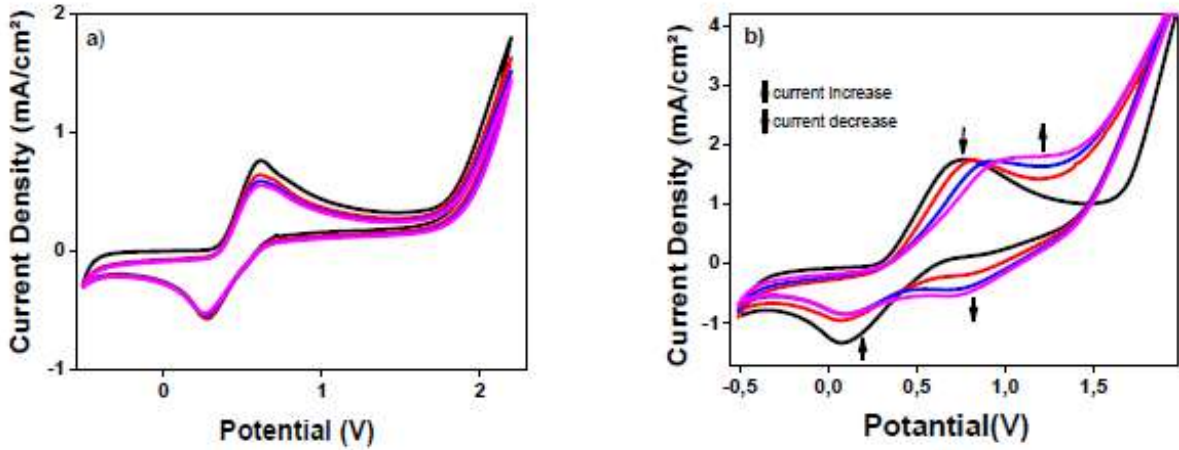
ThFc-Ni ^1H -NMR ve ^{31}P -NMR spektrumları ile karakterize edilmiştir. Şekil 12 a ve b' de ThFc-Ni malzemesinin ThFc-Ni ^1H -NMR ve ^{31}P -NMR spektrumları verilmiştir.



Şekil 14. ThFc-Ni ^1H -NMR ve ^{31}P -NMR spektrumları

-0.5 ile 2.2 V arasında, 200 mV/s tarama hızıyla ThFc-Ni'ye ait dönüşümlü voltomogramı Şekil 15.a da gösterilmektedir. ThFc-Ni polimerleştirilmesinde, biri ferrosen içeren kısma ait

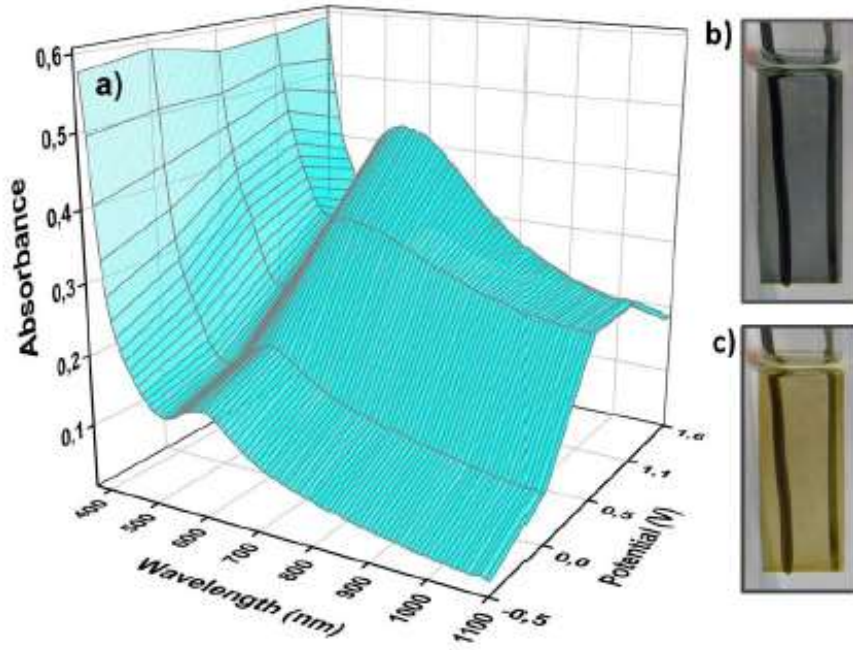
(anodik pik potansiyeli 0.60 V ve katodik pik potansiyeli 0.27 V) tersinir, diğeri ise tiyofenin yükseltgenmesinden oluşan ~2.0 V'da gözlenen anodik pik potansiyeline sahip tersinir olmayan iki redoks süreç olduğu bulunmuştur. Bu koşulların hiç biri iletken elektroaktif bir film oluşmasına neden olmamıştır. Sabit potansiyel, sabit akım ya da CV' den herhangi biri kullanılarak ITO kaplı cam yüzey üzerinde Th ile ThFc-Ni'in elektrobirikimli olarak elde edilebileceği bulunmuştur. Büyüme sırasında elde edilen voltamogramlar, potansiyel döngü sayısının artması ile akımda beklenen artış, büyüyen elektroaktif polimerin, iletken olduğunu göstermektedir. Aynı koşullarda alınan ThFc'nin artış gösteren CV'si ile karşılaştırıldığında, ferrosen redoks çiftine benzer bir redoks çift tespit edilmiştir. Yardımcı monomerin yükseltgenmesi ferrosenin oksidasyonundan sonra gerçekleşmekte olup 1.64 V potansiyelde başlamaktadır.



Şekil 15. ThFc-Ni'ye ait Dönüşümlü Voltamogram (a) ThFc-Ni ve Th (b) 200 mV/s tarama hızında (1:1) BFEE/ACN içinde)

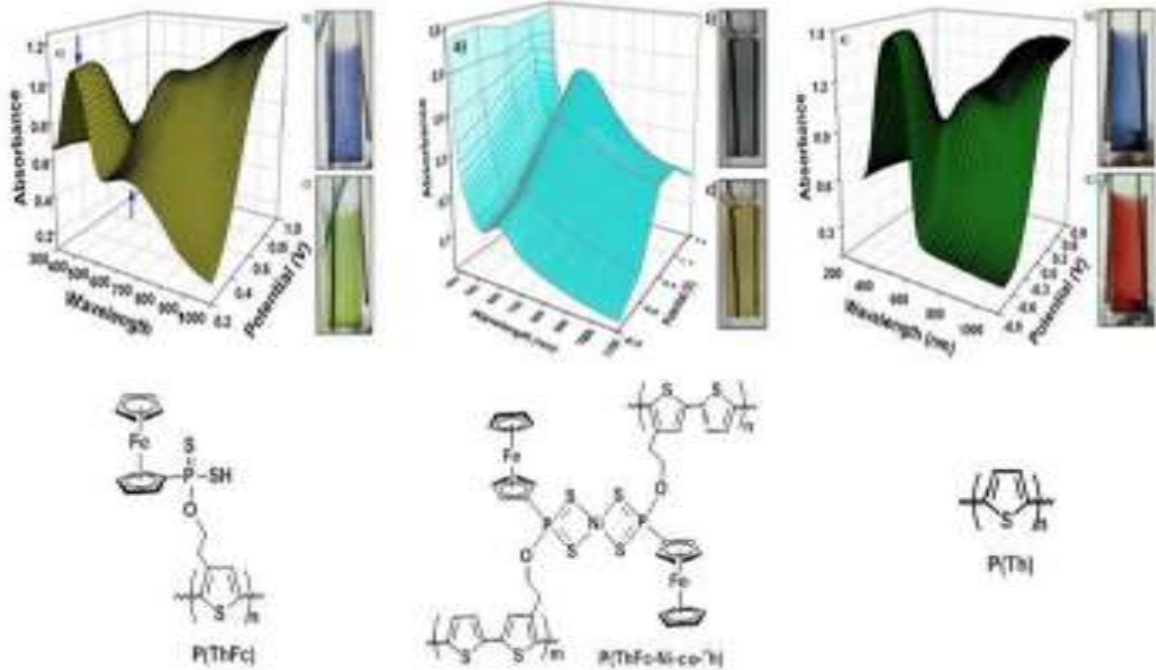
3.1.5 P(Th), P(ThFc) ve P(ThFc-Ni) spektroeletrokimyasal özellikleri

P(ThFc-Ni-co-Th) filmi, ThFc-Ni (0.05 M) ve Th (0.01) içeren ACN içerisinde, ITO üzerinde, 1.8 V sabit potansiyelde sentezlenmiştir ve ardından monomer içermeyen BFEE çözeltisi içerisinde spektroeletrokimyasal çalışmalar yapılmıştır.(Şekil 14.a) P(ThFc-Ni-co-Th) polimerine ait sırasıyla nötral ve yükseltgenmiş halde sarı ve mavi arasında renk değişikliği olduğu saptanmıştır. P(ThFc)'nin yükseltgenmiş haldeki rengi Şekil 14' de verilmiştir.



Şekil 16. Spektroelektrokimya (a) P(ThFc-Ni)'in BFEE-ACN (1:1) içerisindeki yükseltgenmiş haldeki rengi (b) +1.6 V'da mavi renk (L:49, a:1, b:-14) (c) -0.5 V'da Yeşil renk (L:77, a:-3, b:42)

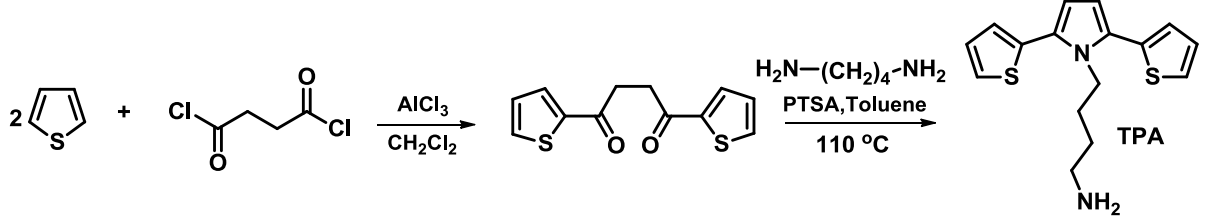
Th, ThFc, ve ThFc-Ni spektroelektrokimyasal özellikleri ve redoks renkleri Şekil 17' de karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.



Şekil 17. ThFc, ThFc-Ni, ve Th'in spektroelektrokimyasal özellikleri ve redoks renkleri

3.2 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)bütan-1-amin (TPA)

3.2.1 TPA' nın Sentezi



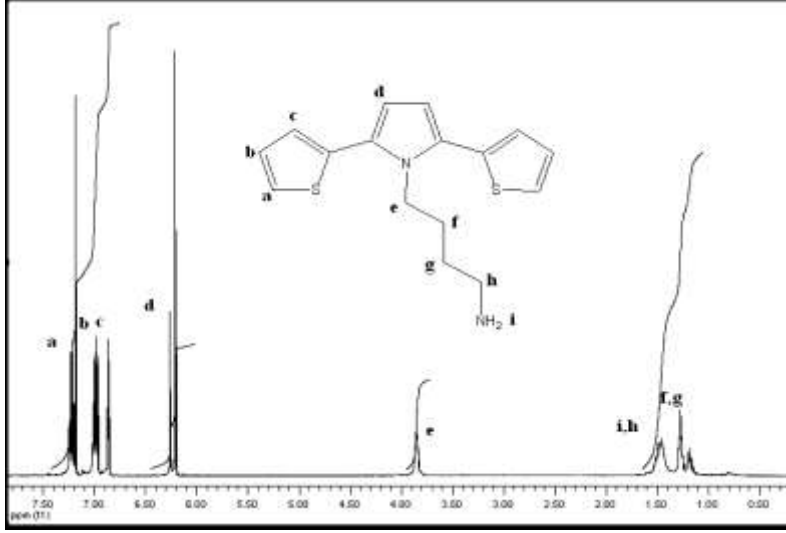
Şekil 18. TPA' nın sentez şeması

Sentezin ilk basamağında tiyofen ve süksinildiklorür $AlCl_3$ katalizörlüğündeki Friedel Craft reaksiyonu ile 1,4-bis(2-tiyenil)bütan-1,4-dion sentezlenmiştir. Daha sonra katalitik miktarda p-toluen sülfonik asit varlığında 1,4 diamino bütan ile reaksiyon sonucunda 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)bütan-1-amin (TPA) sentezlenmiştir (Şekil 16).

100 ml'lik balona 16 ml DCM çözücüsü ve $AlCl_3$ (16g, 0,12 mol) konularak damlatma hunisine yardımıyla tiyofen(9.6 ml, 0,12 mol) , süksinil diklorür(5.6 ml ,0.5 mol) ve 10 ml DCM çözücüsü eklendi. Sıcaklık 20 dereceyi geçmeyecek şekilde 4 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Bu sürenin sonunda karışıma 7 ml HCl eklenerek sırasıyla DCM, 2M HCl ve % 5 lik $NaHCO_3$ çözeltileriyle ekstrakte edildi. Çözücünün uzaklaştırılmasından sonra madde etanolde kristallendirilerek % 53 verimle 1,4-bis(2-tiyenil)bütan-1,4-dion sentezlendi.

3.2.2 TPA' nın 1H -NMR Spektrumu

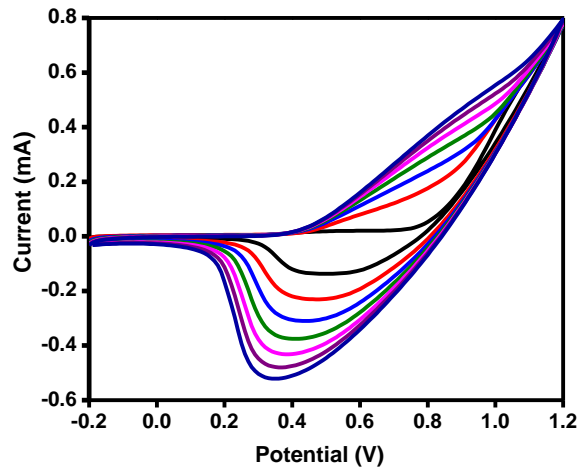
TPA'nın 1H -NMR spektrumu Bruker marka 400MHz NMR cihazı ile çekilmiş ve yapıya ait pikler ve bu piklere ait integraller Şekil 17' de verilmiştir. NMR spektrumundan da görüldüğü gibi hedeflenen yapı saf olarak elde edilmiştir.



Şekil 19. TPA monomerinin 1H-NMR spektrumu

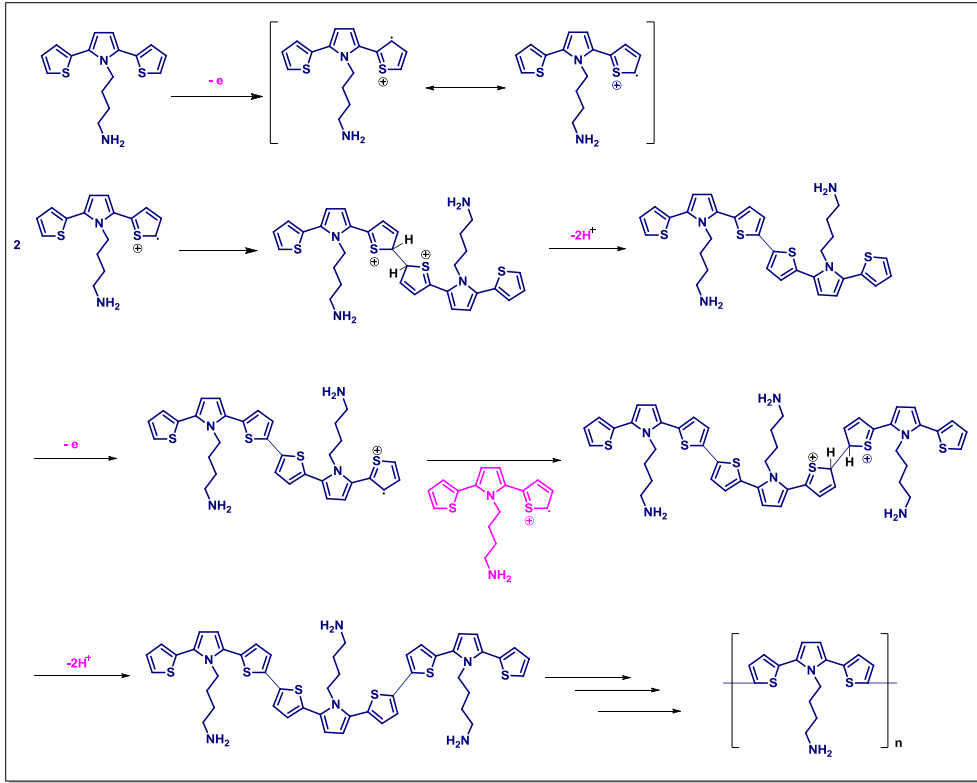
3.2.3 TPA' nın elektrokimyasal polimerleştirilmesi

TPA elektrokimyasal olarak polimerleştirilmesi ACN-DCM (9:1 v:v) içerisinde LiClO₄ destek elektrolit varlığında gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal hücre; ITO kaplı cam çalışma elektrodu, pilatin tel karşıt elektrodu ve gümüş tel referans elektrodundan oluşturulmuştur. Şekil 18'de gösterilen TPA' nın Döngülü -0.2:1.2 V aralığında 250 mV/s tarama hızında alınan döngülü voltametesinden de görülebileceği gibi TPA polimerleşerek iletken polimer olan P(TPA) oluşturmaktadır.



Şekil 20. TPA'nın -DCM (9:1 v:v) içerisinde LiClO₄ destek elektrolit varlığında 250 mV tarama hızı uygulanarak alınan döngülü voltametre grafiği

TPA'nın elektrokimyasal polimerleşme mekanizması Şekil 19'da gösterilmiştir.

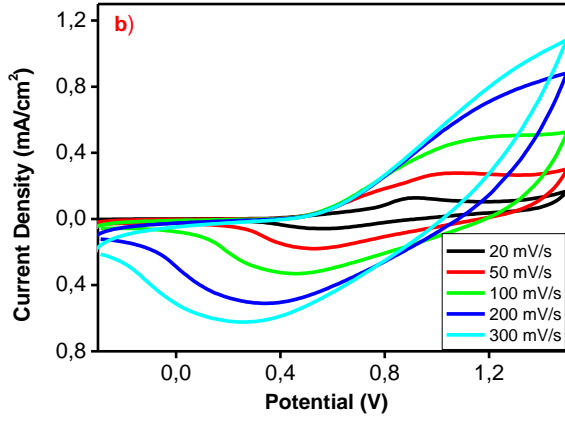


Şekil 21. TPA'nın elektrokimyasal polimerleşme mekanizması

TPA'da diğer tiyofen ve pirol türevleri ile aynı mekanizma ile elektropolimerleştiği düşünülmektedir. Buna göre önce monomer üzerinde yükseltgeme ile radikal kation oluşmakta oluşan radikal diğer bir monomer üzerindeki radikalle birleşerek di-katyonik dimeri oluşturmakta ve yapıdan iki hidrojen ayrılmasıyla yapının dimeri oluşmaktadır. Dimerik yapılar aynı şekilde yükseltgenerek daha yüksek molekül ağırlıklı oligomerleri ve polimerik yapıları oluşturmaktadır.

3.2.4 P(TPA)'nın Tarama Hızına Bağlı Pik Akım Değerleri

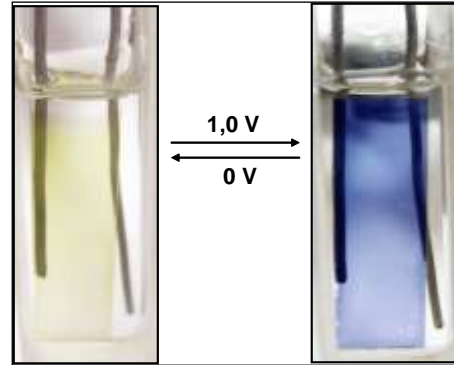
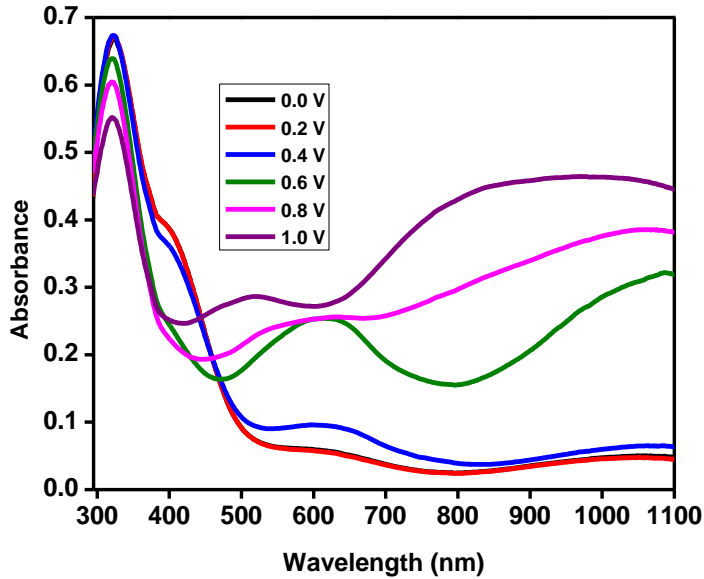
P(TPA)'nın sabit potansiyelde filmi hazırlanarak, monomer içermeyen elektrolitik çözeltide farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri alınmıştır. Şekil 20' de belirtilen polimerin farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramı gösterilmektedir. Akım değerlerinin tarama hızlarıyla doğru orantılı olması polimer filmin elektroaktif olduğunu ve elektroda iyi bağlandığını göstermektedir.

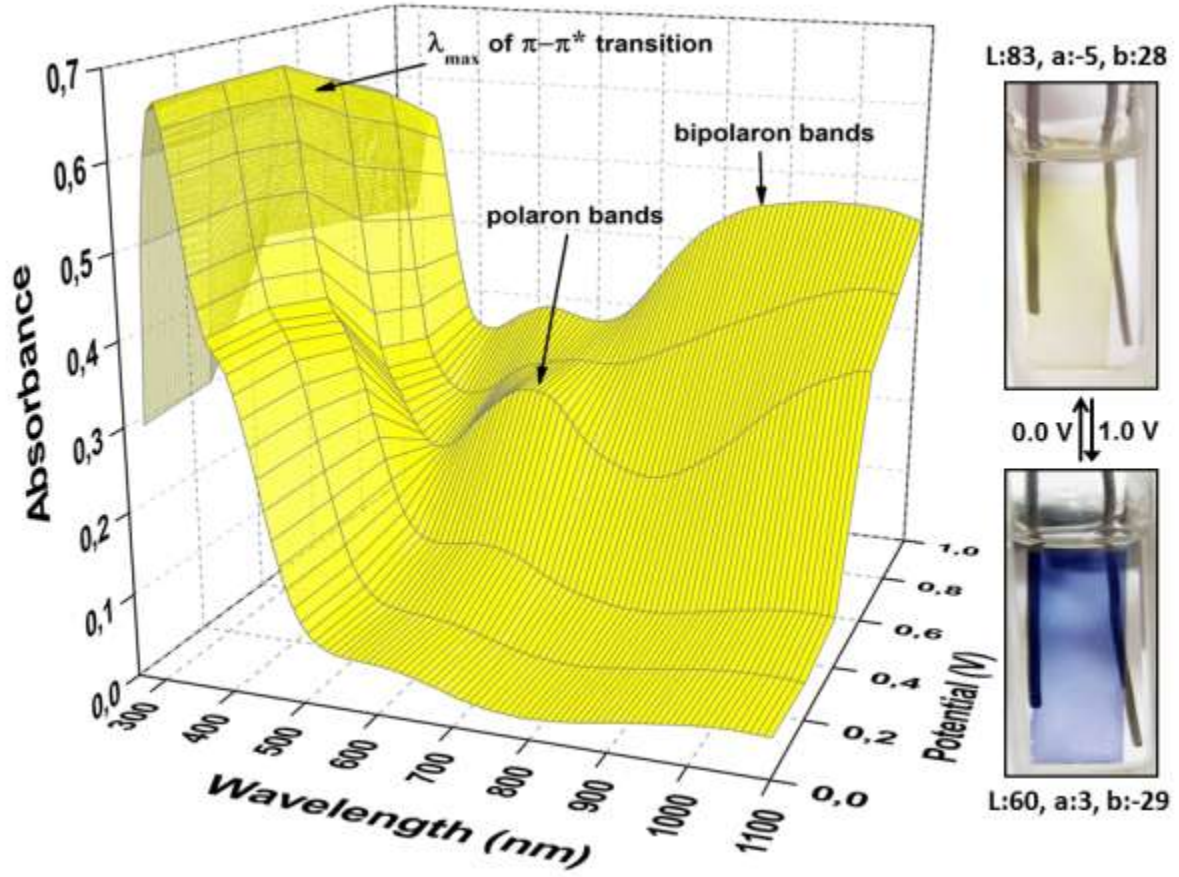


Şekil 22. Farklı tarama hızlarında (0.02 V– 0.3 V/s) P(TPA)'e ait dönüşümlü voltametri grafiği

3.2.5 P(TPA)' nin spektroeletrokimyasal özellikleri

Spektroeletrokimyasal özellikler Bölüm 2.2.2' de bahsedilen yöntemle incelenmiştir. 0,0V ile 1,0 V arasında potansiyel değişimleri ile alınan UV spektrumları ile oluşturulan grafik Şekil 21' de gösterilmiştir. En indirgenmiş haldeki spektrumdan μ - μ^* geçişine ait absorpsiyon pikinden dalga boyu eksenine (x-ekseni) çizilen teğetin kesim noktasından hesaplanan band boşluğu enerjisi 2,7 eV' dir. P(TPA) nötral durumda sarı yükseltgenmiş halde ise mavi renklidir. Bu renkler Şekil 21' de gösterilmiştir.

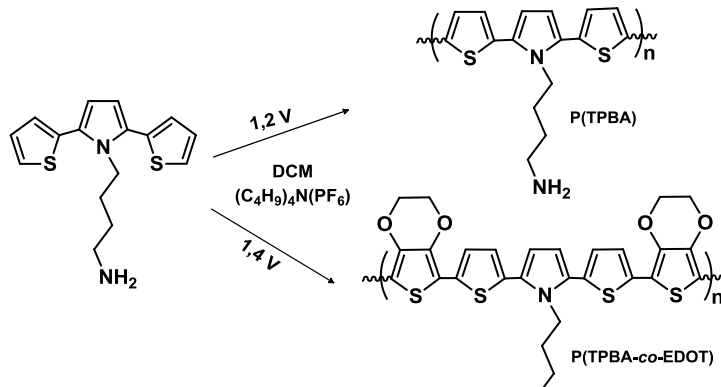




Şekil 23. P(TPA)'nın iki ve üç boyutlu spektrokimyasal grafiği ve nötral (açık sarı) ve yükseltgenmiş (mavi) hallerinin renkleri

3.2.6 TPA'nın EDOT ile kopolimerleştirilmesi

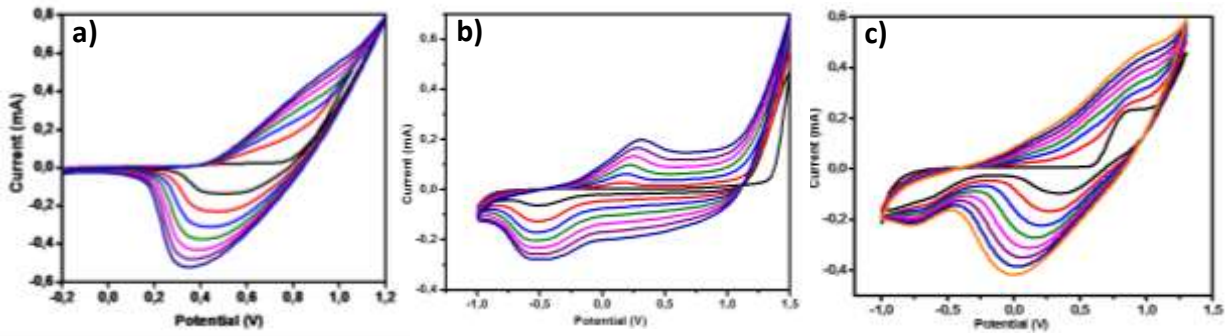
TPA elektrokimyasal olarak polimerleştirilmesi ACN-DCM (9:1 v:v) içerisinde LiClO_4 destek elektrolit varlığında gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal hücre; ITO kaplı cam çalışma elektrodu, pilatin tel karşıt elektrodu ve gümüş tel referans elektrodundan oluşturulmuştur. TPA polimerleşerek iletken polimer olan P(TPA)'yı oluşturmaktadır. TPA'nın elektrokimyasal polimerleştirilmesi ve EDOT ile kopolimerleştirilmesi reaksiyonları Şekil 22'de verilmiştir.



Şekil 24. P(TPA) ve P(TPA-co-EDOT)'un sentez şeması

3.2.7 P(TPA-co-EDOT)'un sentezi

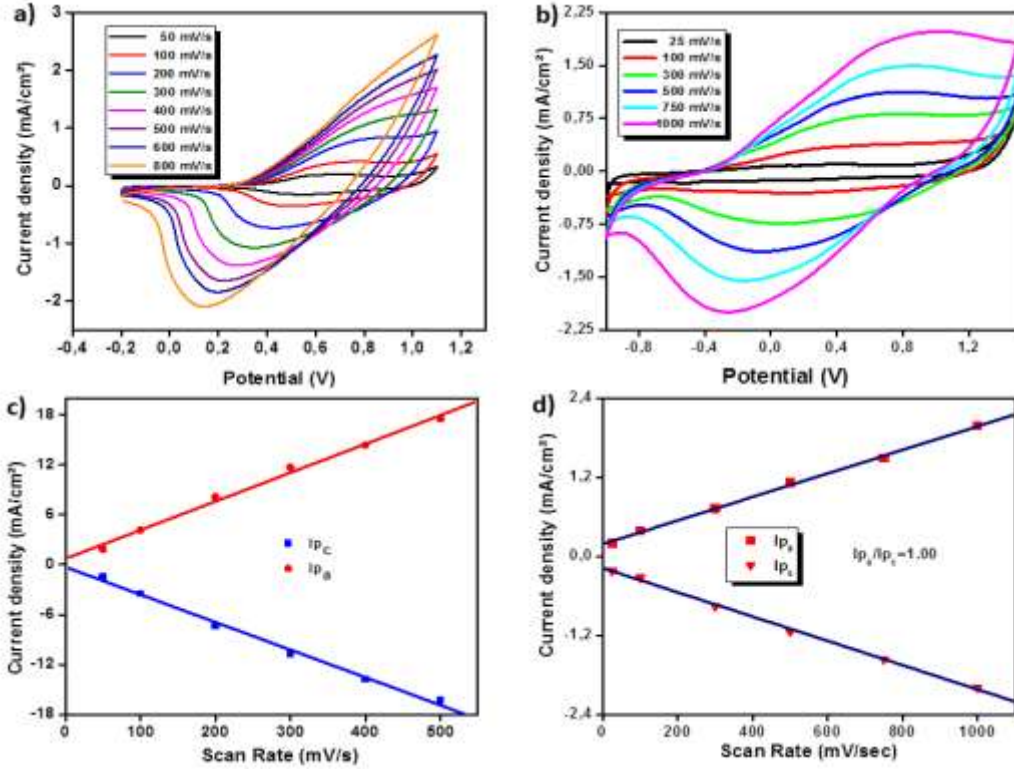
TPA, EDOT ve EDOT varlığında TPA ayrı ayrı dönüşümlü voltametri ile polimerleştirilmiştir. P(TPA) +0,5:+1,0 V aralığında yükseltgenirken 0,35 V'da indirgenmektedir (Şekil 23a). EDOT ise 0,25 V yükseltgenirken -0,50 V civarında indirgenmektedir (Şekil 23b). Bu iki monomeri içeren çözelti polimerleştirildiğinde ise -2,0:+1,2 V aralığında yükseltgenirken 0,0 V'da indirgenmektedir (Şekil 23c). ACN: DCM(9:1)/LiClO₄ çözücü:destek elektrolit çifti kullanılarak ve 250 mV tarama hızında alınan dönüşümlü voltametri grafiklerinin şekil ve potansiyel değerleri farklılığından TPA ve EDOT monomerlerinin P(TPA-co-EDOT) polimeri oluşturmak üzere kopolimerleştiğini göstermektedir. Kopolimerleşme; spektroelektrokimyasal deneyler ile de doğrulanmıştır.



Şekil 25. a) TPA, b) EDOT ve c) EDOT-TPA (1:1) aynı şartlar uygulanarak alınan dönüşümlü voltametri grafikleri

3.2.8 P(TPA) ve P(TPA-co-EDOT) Pik Akım Değerlerinin Tarama Hızı ile Değişimi

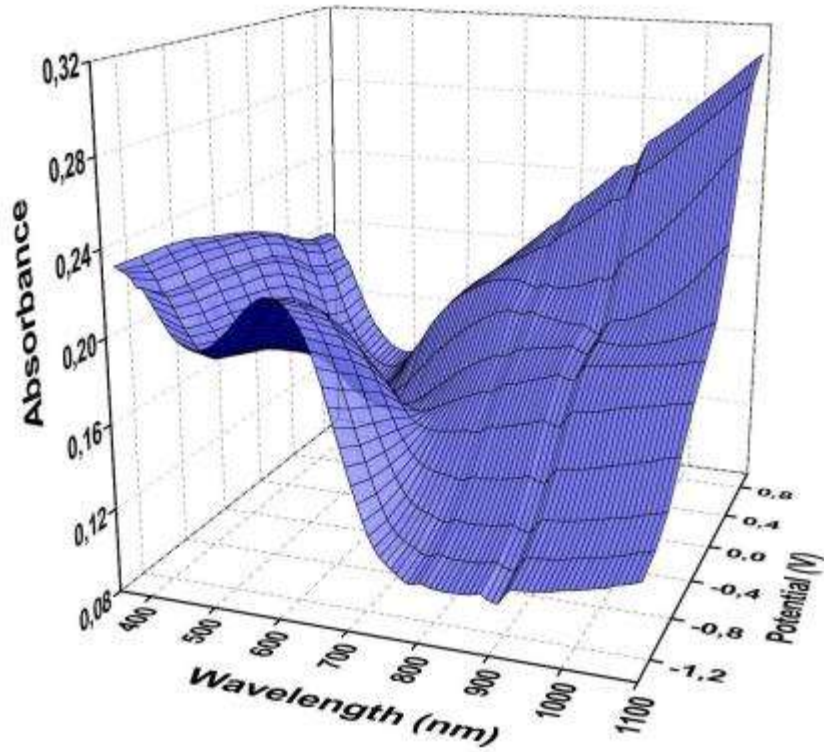
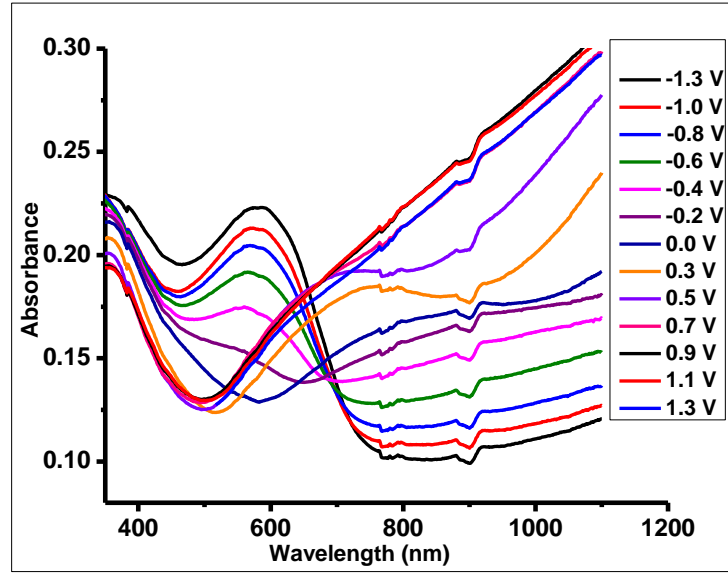
P(TPA) ve P(TPA-co-EDOT) filmleri sabit potansiyel elektrolizi ile hazırlanmış ve filmler DCM ile yıkanarak monomer kalıntıları ve oligomerler uzaklaştırılmıştır. Bu filmlerin monomersiz çözücü-destek elektrolit sistemindeki redoks döngüsü incelenmiştir. Şekil 24, P(TPA) ve P(TPA-co-EDOT) farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltametrilerini göstermektedir. Bu grafikler incelendiğinde akımın direk olarak tarama hızıyla orantılı doğru orantılı olması polimer filmlerinin elektroaktif ve elektrot yüzeyine iyi bir şekilde tutunduğunu göstermektedir. P(TPA) ve P(TPA-co-EDOT) için anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızının bir fonksiyonu olarak doğrusal değişim grafikleri sırasıyla Şekil 24 (c ve d)'de gösterilmiştir. Bu grafikler elektrokimyasal prosesin difüzyon kontrollü olmadığını ve yüksek tarama hızlarında bile tersinir olduğunu göstermektedir.



Şekil 26.a) P(TPA) and b) P(TPA-co-EDOT) filmlerinin farklı tarama hızlarındaki CV grafikleri. c) P(TPA) ve d) P(TPA-co-EDOT) için tarama hızlarına karşı pik akımlarının değişim grafikleri

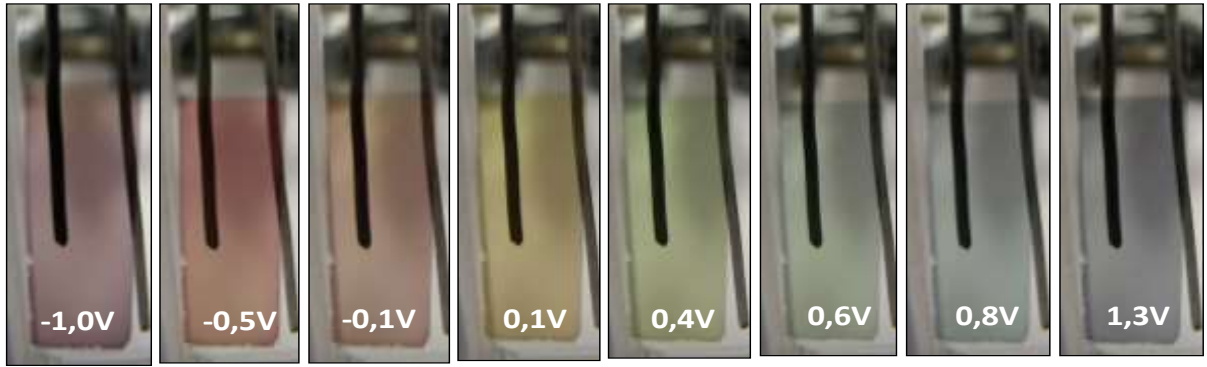
3.2.9 P(TPA-co-EDOT)'un spektrokimyasal özellikleri

İlk olarak sabit potansiyel 1,3 V uygulanarak LiClO₄ (0,1 M) destek elektrolit ve DCM-ACN (1:9 v:v) çözücü ortamında eşit molariteye sahip TPA ve EDOT monomerleri (0.05 M) ITO kaplı cam elektrot üzerinde kopolimerleştirilmiştir. Elde edilen ITO cam üzerindeki kopolimer DCM ile muamele edilerek kalıntı monomer ve oligomerler uzaklaştırılmıştır. Spektroelektrokimya denemeleri için içerisinde destek elektrolit ve ACN bulunan UV küvetine ITO cam elektrot üzerindeki kopolimer konularak değişen potansiyel değerleri için UV spektrumları alınmıştır. -1.3V ile 1,3 V arasında potansiyel değişimleri ile alınan UV spektrumları ile oluşturulan grafik Şekil 25' te gösterilmiştir.



Şekil 27. P(TPA-co-EDOT) kopolimerine ait iki ve üç boyutlu spektrokimya grafiği

En indirgenmiş haldeki spektrumdan $\mu\text{-}\mu^*$ geçişine ait absorpsiyon pikden dalga boyu eksenine (x-ekseni) çizilen teğetin kesim noktasından hesaplanan bant boşluğu enerjisi 1,59 eV'dur. Dolayısıyla kopolimerle ile P(TPA)'nın 2,70 eV olan bant boşluğu enerjisi 1,59 eV'a kadar düşmüştür. P(TPA)'nın nötral ve yükseltgenmiş haldeki renkleri mavi ve sarı iken; bu monomerin EDOT'la kopolimerinin (P(TPA-co-EDOT)) nötral ve yükseltgenmiş halleri arasında toplam sekiz farklı renk oluşmaktadır. Bu renkler ve ait oldukları potansiyel değerleri Şekil 26' da gösterilmiştir.



Şekil 28. P(TPA-co-EDOT)'un uygulanan farklı potansiyellerde sahip olduğu renkler

3.2.10 Filmlerin İletkenlikleri

Elde edilen filmlerin iletkenlikleri dört nokta temas yöntemi ile ölçülmüştür. P(TPA), PEDOT ve kopolimer P(TPA-co-EDOT) filmlerinin iletkenlikleri Tablo 1' de verilmiştir. PEDOT 0.1 Scm^{-1} gibi iyi bir iletkenlik gösterirken, P(TPA)'nın iletkenliği $3.0 \times 10^{-3} \text{ Scm}^{-1}$ dir. Tablo 1'den de görüleceği gibi (P(TPA-co-EDOT)'un iletkenliği P(TPA) ve PEDOT' un iletkenliklerinin arasında çıkmıştır. EDOT ünitelerinin P(TPA)'nın yapısına girmesiyle iletkenlikte artışa sebep olmuş ve P(TPA)'nın potansiyel uygulama alanlarını genişletmiştir.

Tablo 1. Polimerlerin iletkenlikleri

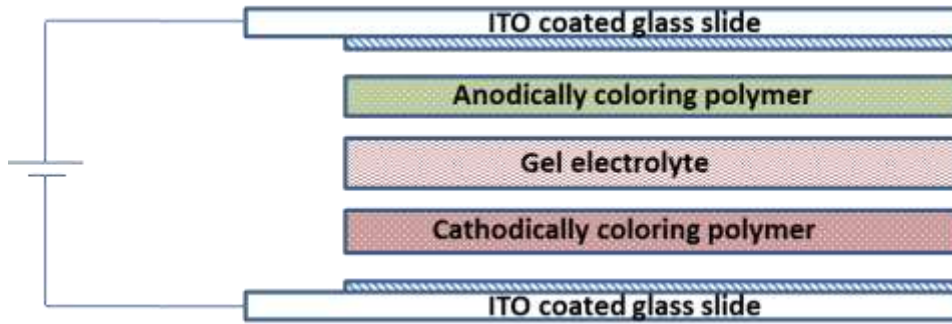
Polimer	İletkenlik (Scm^{-1})
P(TPA)	3.0×10^{-3}
P(TPA-co-EDOT)	5.0×10^{-2}
PEDOT	1.0×10^{-1}

3.2.11 Jel Elektrolit Hazırlanması

Polimetilmetakrilat (PMMA - MW: 350,000) bazlı jel elektrolit PMMA ve Tetrabutil amonyum tetrafloroborat (THFP₆) elektrolitinin propilen karbonat (PC) yardımıyla hazırlanmıştır. PC plastikleştirici olarak kullanılmıştır. Asetonitril (ACN) yüksek buhar basıncı çözücü olarak hammaddelerin kolayca karışmasını sağlamaktadır. Ağırlıkça oran olarak çözeltinin içeriği ACN:PC:PMMA:THFP₆ is 70:20:7:3. Hazırlanan jel elektrolit polimer elektrokromik cihazının hazırlanması amacıyla kullanılmıştır.

3.2.12 Elektrokromik Cihazların Hazırlanması (ECDs)

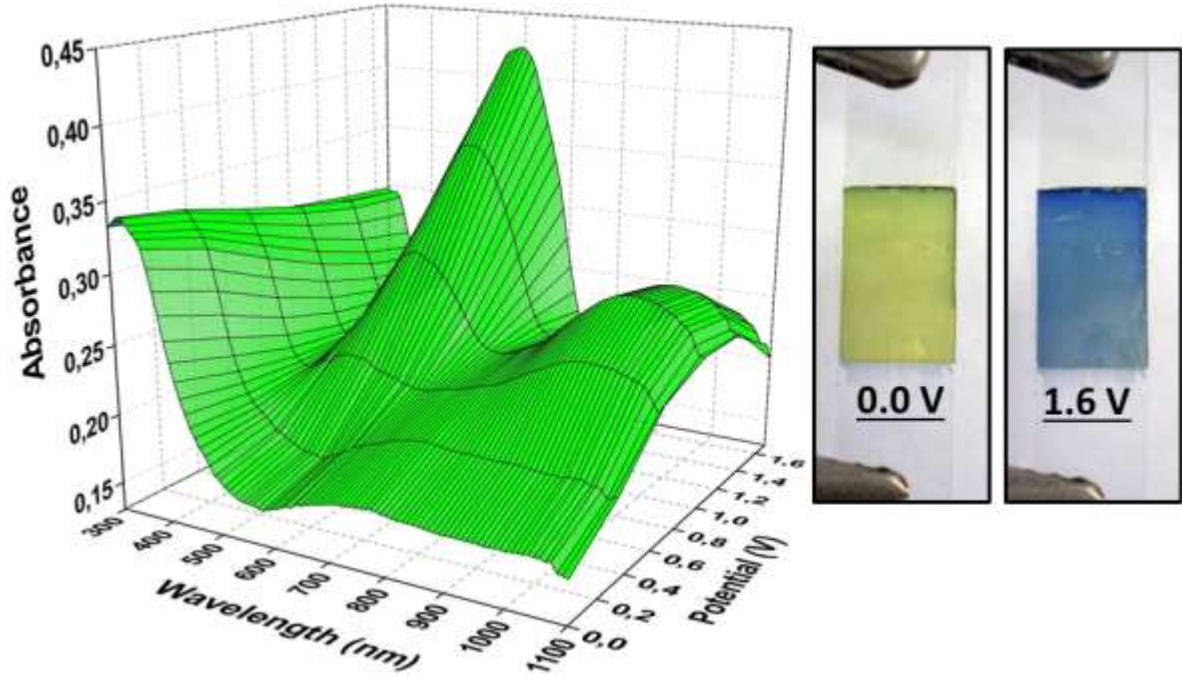
ECDs iki tamamlayıcı polimerle hazırlanmıştır. P(TPA) ve P(TPA-co-EDOT) anodik olarak renklenen malzeme ve PEDOT ise katodik olarak renklenen malzeme olarak düşünülmüştür. P(TPA) ya da P(TPA-co-EDOT) ve PEDOT filmleri elektrokimyasal olarak ITO kaplı cam elektrot yüzeylerine kaplanmış ve arada jel elektrolit olacak şekilde iki polimer kaplı cam elektrot (biri yükseltgenmiş halde iken diğeri indirgenmiş halde) yapıştırılarak ECDs sandwich konformasyonunda hazırlanmıştır. ECDs için kullanılan tasarım Şekil 27'de gösterilmiştir.



Şekil 29. Elektrokromik cihazların şematik gösterimi

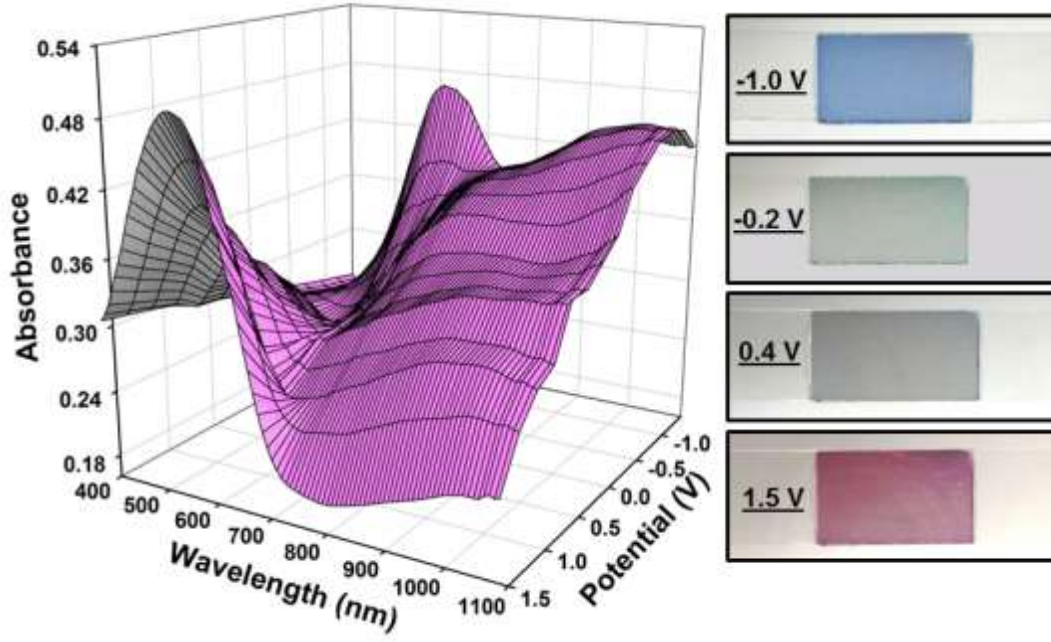
P(TPA)/PEDOT ve P(TPA-co-EDOT)/PEDOT oluşan ECDs hazırlanarak her birinin spektroeletrokimyasal özellikleri incelenmiştir. ECDs hazırlanırken katodik olarak renklenen (PEDOT) tamamen yükseltgenmiş durumda, anodik olarak renklenen P(TPA) yada P(TPA-co-EDOT) tamamen indirgenmiş durumda bulunmaktadır. P(TPA)/PEDOT cihazı 0.2 V ve 1.6 V arasında dönüşüm yaparken, P(TPA-co-EDOT)/PEDOT cihazı ise -1.0 ve 1.5 V arasında dönüşüm yapmaktadır. Spektroeletrokimyasal sonuçlardan 0.0 V'da P(TPA) katmanı nötral durumda iken PEDOT katmanı yükseltgenmiş durumda olduğu ve cihazın renginin bu nedenle sarı olduğu saptanmıştır. Uygulanan potansiyel yükseldikçe P(TPA)

katmanı yükseltgenirken PEDOT katmanı indirgenmektedir. Bu sebeple 1,6 V'da indirgenmiş PEDOT'un mavi rengi ve yükseltgenmiş P(TPA) da mavi renginden dolayı cihaz mavi renklidir. (Şekil 28)



Şekil 30. P (TPA)/PEDOT cihazının spektroeletrokimyasal özellikleri ve farklı potansiyelerde oluşan renkler

P(TPA-co-EDOT)/PEDOT elektrokromik cihazının farklı potansiyelerde (-1.0 V'dan ve +1.5 V'a kadar) alınan UV spektrumlarından oluşan spektroeletrokimyasal grafiği Şekil 29'da gösterilmiştir. Pozitif potansiyelerde yaklaşık 580 nm'de π - π^* geçişinden kaynaklanan pik gözlenir. Bu durumda PEDOT UV-vis bölgesinde herhangi bir absorpsiyon gözlenmez. Negatif potansiyelerde anodik olarak renklenen P(TPA-co-EDOT) π - π^* geçiş absorpsiyonu azalırken PEDOT katmanının indirgenmesiyle 615 nm'de yeni bir absorpsiyon gözlenir (Şekil 29). Açık gri renk -0.2 V'da gözlenirken, açık yeşil renk ise 0.4 V'da gözlenir.



Şekil 31. P(TPA-co-EDOT)/PEDOT elektrokromik cihazının spektroeletrokimyasal özellikleri ve farklı potansiyellerde gözlenen renkleri

Polimer ve cihazların spektroeletrokimyasal özellikleri Tablo2'de verilmiştir.

Tablo 2. Polimer ve cihazların elektronik ve elektrokromik özellikleri

	λ_{\max} (nm)	Potential (V)	L	a	b	E_g (eV)
P(TPA)	321	0.0	83	-5	28	2.39
		1.6	60	3	-29	
PEDOT	620	-1.0	-	-	-	1.60
		1.4	-	-	-	
P(TPA-co-EDOT)	580	-1.3	40	9	5	1.68
		-0.8	49	18	15	
		-0.4	57	9	10	
		-0.2	61	2	25	
		0.2	64	-7	19	
		0.4	61	-3	8	
		0.7	58	-2	2	
		1.0	40	1	-2	
P(TPA)/PEDOT	325	0.0	78	-16	46	-
Cihazı	610	1.6	54	-7	17	
P(TPA-co-PEDOT) /PEDOT Cihazı	575	-1.0	65	-4	-21	-
		-0.2	76	-9	13	
		0.4	67	-3	7	
		1.5	50	29	4	

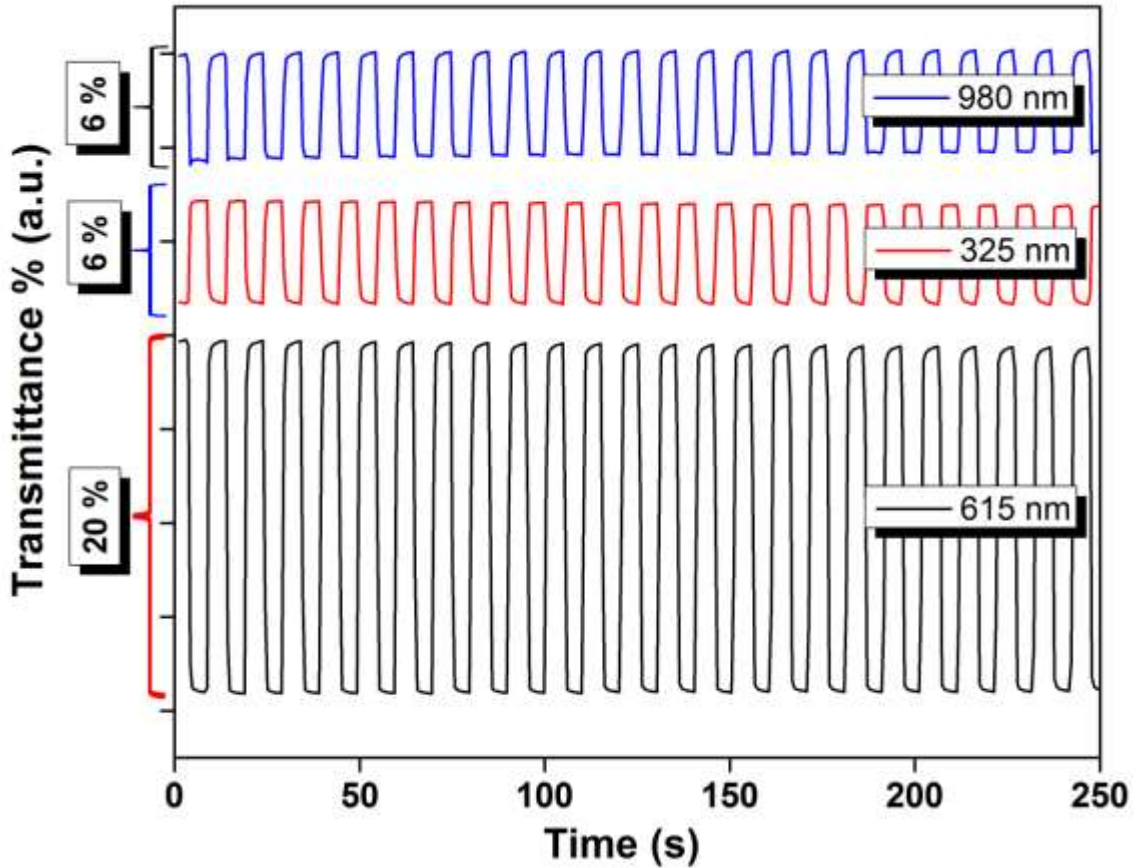
3.2.13. Kolorimetri

Elektrokimyasal malzemelerin renginin tam olarak tanımlanması kolorimetri ölçümleri ile gerçekleştirilir. The Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) sistemi renkleri karşılaştırma ve kantitatif skala kullanarak renkleri tanımlar. Kolorimetri ölçümleri Minolta CS-

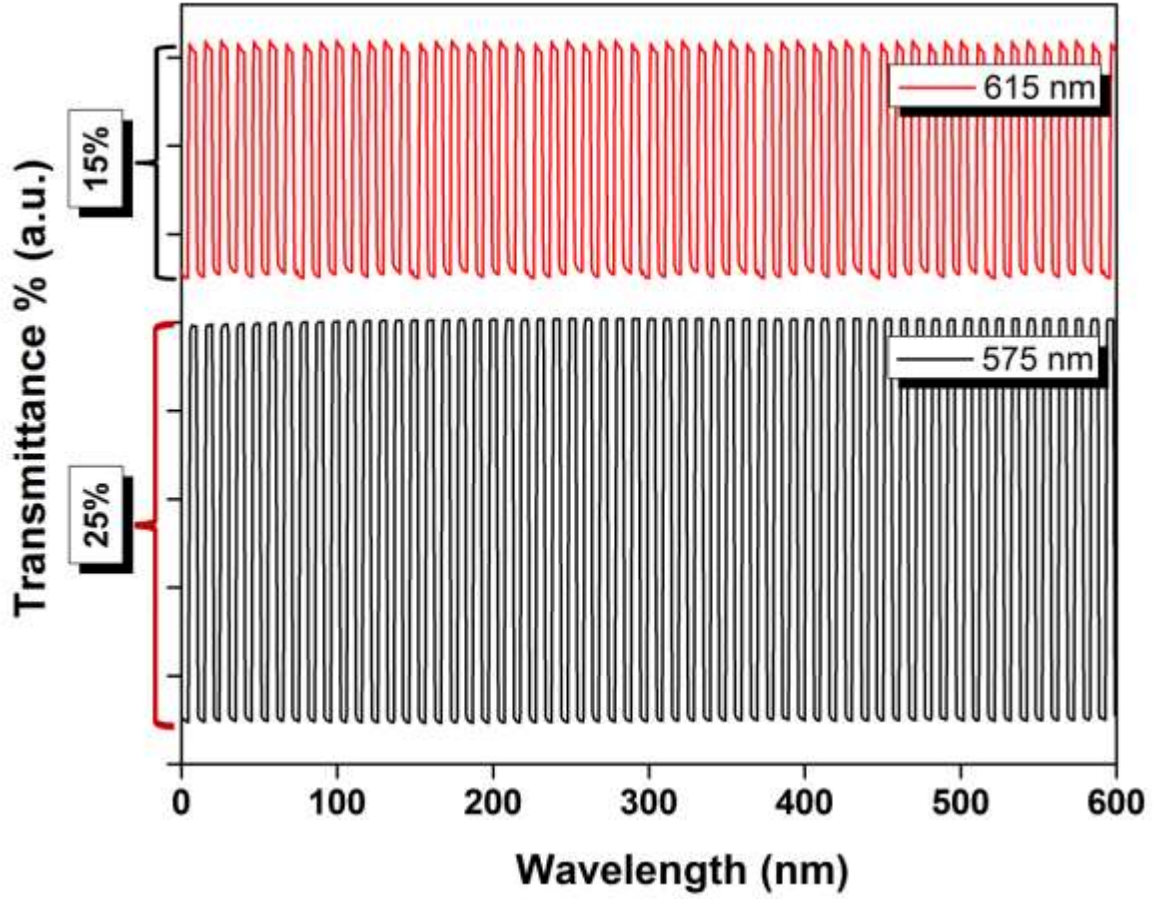
100 spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Rengin 3 özelliği renk (a), doygunluk (b) ve lüminans (L) ölçülmüş ve Tablo 2'de verilmiştir.

3.2.14. Renk Değişimi

İletken polimerlerin hızlı ve keskin renk değişimini göstermesi son derece önemlidir. Kronoamperometri elektrokromik cihazların tepki zamanını ölçmek amacıyla kullanılır. Belli bir zaman diliminde polimer film en yükseltgen hali ve en indirgen hali arasında sürekli olarak dönüşüm yaptırılır. Deney süresince maksimum kontrasttaki yüzde transmittans değerleri UV-vis spektrofotometresi ile ölçülür. P(TPA) cihazı için 0.0 V ve +1.6 V arasında 5 s. Süreyle yapılan ölçümlerde maksimum kontrast ($\Delta T\%$) ve tepki zamanı 20% ve 1.3 s olarak ölçülmüştür. (Şekil 30). P(TPA-co-EDOT) cihazı için tepki zamanı ve $\Delta T\%$ değerleri -1.0 V ve +1.5 V arasında yapılan ölçümler sonucunda 0.8 s and 25 % olarak ölçülmüştür (Şekil 31).



Şekil 32. P(TPA)/PEDOT elektrokromik cihazı için potansiyel uygulaması ile transmittans değişimi grafiği



Şekil 33. P(TPA-co-PEDOT)/PEDOT elektrokromik cihazı için potansiyel uygulaması ile transmittans değişimi grafiği

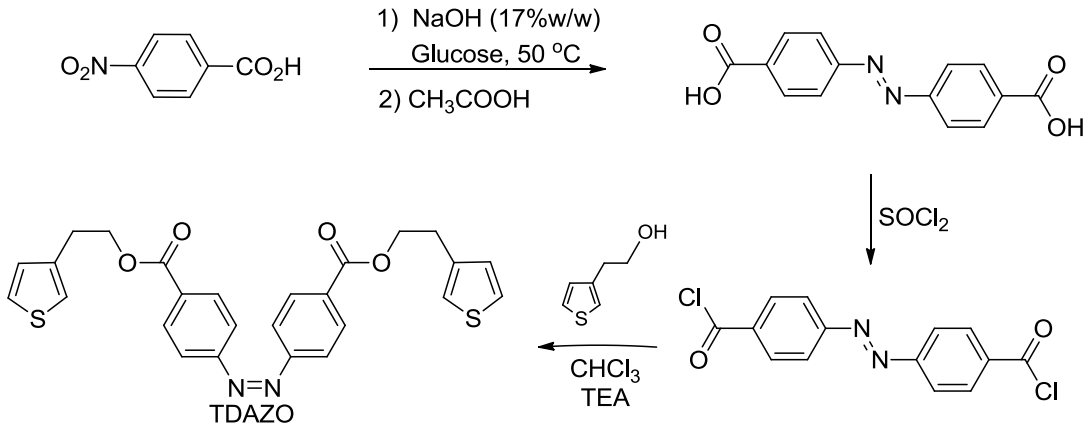
3.3 Bis(4-(3-tiyenil etilen)-oksikarbonil)diazobenzen(TDAZO)

3.3.1 TDAZO sentezi

TDAZO sentezi Şekil 32'de verilen sentez şemasına göre sentezlenmiştir. Bu amaçla, 4,4'-Azodibenzoil klorid, Şekil 32'de gösterilen tipik prosedüre göre hazırlanmıştır. 4-Nitrobenzoik asit, 60°C'de sodyum hidroksit varlığında glukoz ile reaksiyona sokulup ve 4,4'-azodibenzoik asit kantitatif verimle elde edilmiştir. Daha sonra 4,4'-azodibenzoik asit, tiyonil klorid ile reaksiyona sokularak 4,4'-azodibenzoil'e dönüştürülmüştür. Monomer, 3-tiyofen etanol'un diasit klorid ile kondenzasyonu ile sentezlenmiştir. 4,4'-Azodibenzoik asit, literatüre göre kantitatif verimle sentezlenmiştir. Erime noktası >300°C; FT-IR (KBr): 3600–3000 (m, br), 1691 (s), 1600 (s), 1579 (s), 1426 (s), 1300–1200 (s, br), 868 (s), 773 (s) cm⁻¹.

4,4'-Azodibenzoik asit (2 g, 7.4 mmol), 8 ml tiyonil klorid ve 0.1 ml trietilamin içeren yuvarlak dipli bir balona konulmuştur. Süspansiyon halindeki karışım, berrak bir çözelti haline dönüşene kadar yağ banyosunda ısıtılmıştır. Daha sonra, çözelti oda sıcaklığında bir gece boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyona girmeyen tiyonil klorid azaltılmış basınç altında çözüldürülür ve çöken kısım 4,4'-Azodibenzoil klorid'in 2,1 g (93%) kırmızı kristallerini elde etmek için iki kez kuru hekzan ile yıkanmıştır. Erime Noktası 177–179 °C, FT-IR (KBr): 1776 (s), 1732 (m, br), 1595 (m), 1408 (m), 1195 (s, br), 885 (s), 804 (m), 646 (m) cm^{-1} .

2.40 g (21 mmol) 3-tiyofen etanol ve 2.02 g (20 mmol) kuru trietil amin (TEA) geri soğutuculu düzenek altında iki boyunlu yuvarlak dipli balona konulmuş ve 100 ml kuru kloroform içinde çözülmüş 3.07 g (10 mmol) of 4,4'-azodibenzoik asit damlatma hunisi yardımıyla çözelti karıştırılırken damlatılarak balon içerisine ilave edilmiştir. Reaksiyon sürekli karıştırma yapılarak 3 gün boyunca geri soğutuculu düzenek altında tutulmuştur. Daha sonra reaksiyon çözeltisi 1% HCl ve damıtılmış su ile yıkanıp, CaCl_2 üzerinde kurutulmuştur. Çözücü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılıp, 3-tiyofen etanol ve 4,4'-azodibenzoik asit gibi reaksiyona girmeyen maddeler sıcak metanol ile ekstrakte edilmiştir. Ham ürün THF'dan hekzana tekrar çöktürme yöntemiyle turuncu renkli katı elde edilene kadar arıtılmıştır. Süzüldükten sonra, saf ürün TDAZO vakum fırınında kurutulmuştur.

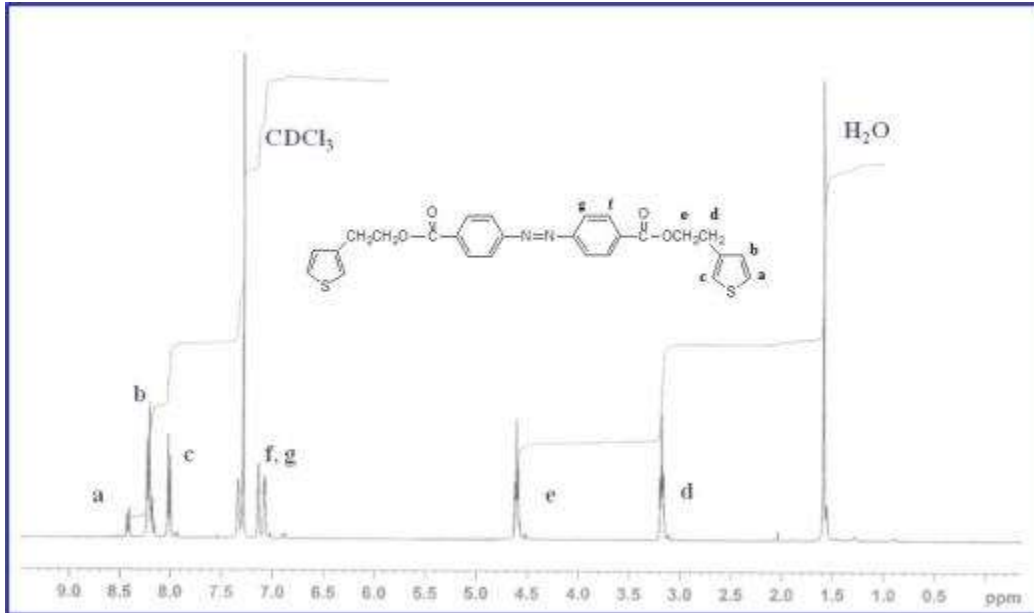


Şekil 34. TDAZO'nun sentez şeması

3.3.2 TDAZO'ya ait NMR ve FTIR Spektrumları

Monomerin, $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda protonlarının tipine ve sayısını karşılık gelen bağlı şiddetin, benzen protonları, tiyofen (Th) ve Th- CH_2 'nin rezonans sinyallerinin varlığı kanıtlanmıştır. (Şekil 33). HMTA için $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm) verileri: 7.4–6.9 ppm (m 6H), 5.6 (br, 2H), 3.7 ppm (s 4H), 3.22 ppm (m 4H), 1.54 (m 4H), 1.25 ppm (m 4H).

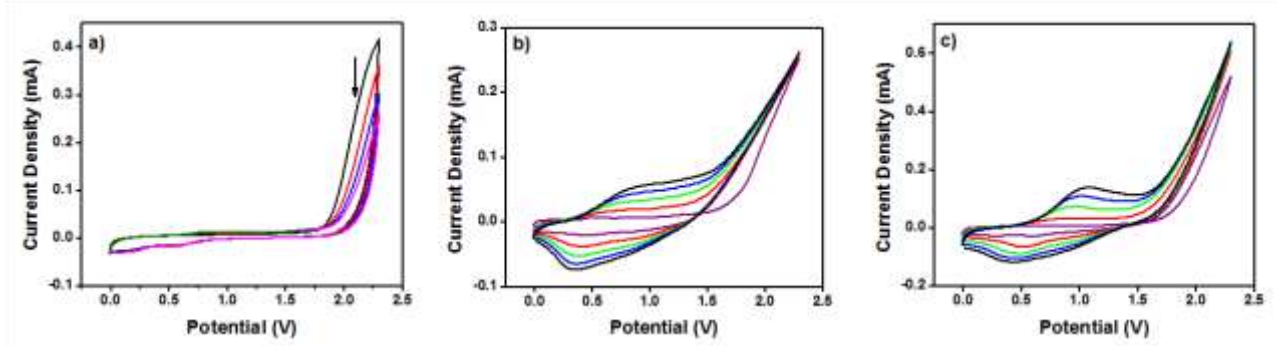
Kopolimer P(TDAZO-co-Py)'ün FTIR spectral karakteristiği monomer ile birlikte ele alınmıştır. C=O gerilme titreşim hareketlerine ait keskin pik 1711 cm^{-1} görülmüş ve TDAZO karakteristik bir özellik göstermiştir. Alifatik metilen gerilmelerine ait iki pik, 2948 cm^{-1} ve 2867 cm^{-1} görülmüştür. C-O-C ester grubu titreşimlerini içeren pik 1251 cm^{-1} ve tiyofen birimlerinde aromatik C-H_a gerilmelerinin neden olduğu pik 740 cm^{-1} 'de görülmüştür. FTIR spectrum of P(TDAZO-co-Py)'ün FTIR spektrumunda dopant iyonlardan kaynaklanan keskin pikler 1044 , 1121 and 1127 cm^{-1} görülmüştür. Alifatik metilen gerilmelerine ait pikler 2924 cm^{-1} ve 2854 cm^{-1} bulunmaktadır. TDAZO'nun karbonil gruplarına ait karakteristik pik 1690 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Bu sonuçlar kopolimerizasyonu gerçekleştiğini kanıtlamıştır.



Şekil 35. TDAZO'nun $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

3.3.3 TDAZO'nun Elektrokimyasal Özellikleri

TDAZO'nun redoks davranışı Dönüşümlü Voltametri(CV) ile incelenmiştir. AN–TBAFB sistemindeki TDAZO'nun CV'nda redoks piklerin yoksunluğundan öncü monomerin elektroaktif olmadığı anlaşılmıştır. (Şekil 34.a). Reaksiyon ortamına Th'ın ilavesinden sonra, artan tarama sayısı ile birlikte redoks piklerinde de artış görülmüştür (Şekil 34.c). Döngü sayısının belirli bir akım değerine kadar saf tiyofenden farklı olduğu gözlenmiştir.(Şekil 34.b).



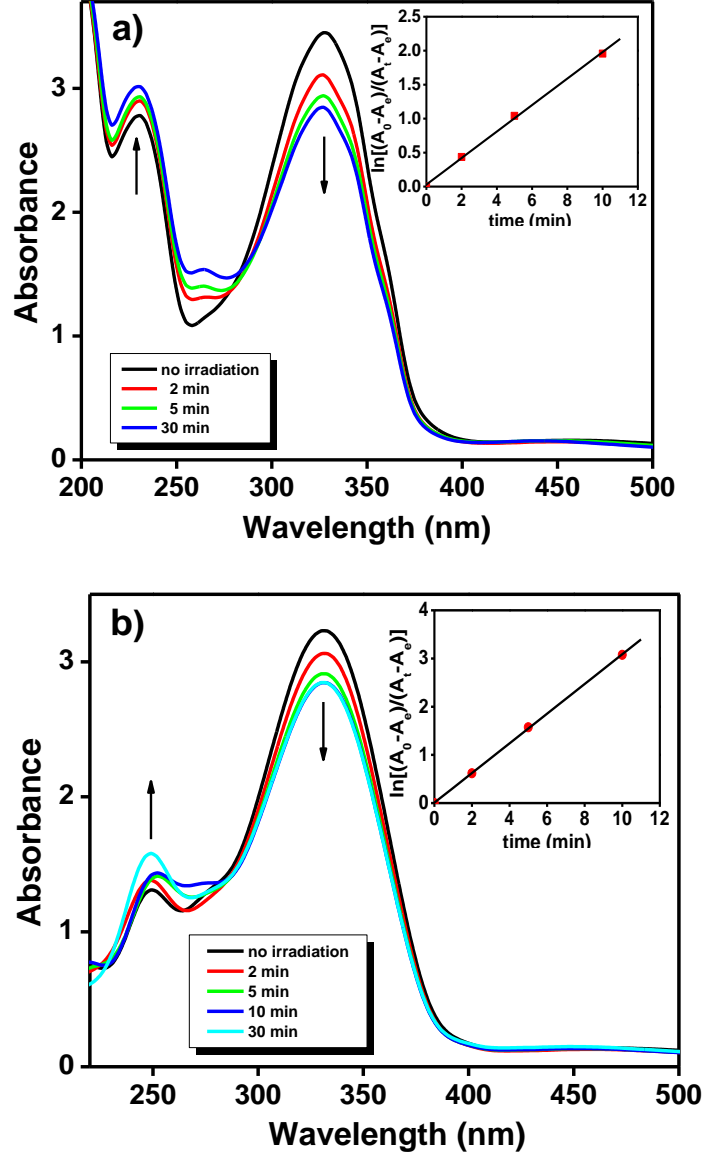
Şekil 36. Dönüşümlü Voltamogramlar (a) TDAZO, (b) Polityofen, (c) 0.1M TBAFB/AN içerisinde, Tiyofen varlığında TDAZO

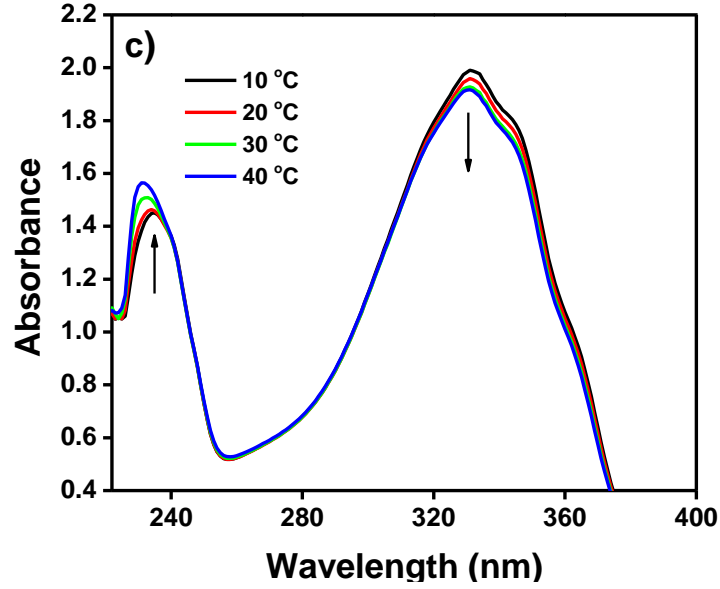
3.3.4 TDAZO'nun Foto ve Termo Duyarlı Davranışı

TDAZO'nun fotoizomerizasyonu asetonytril ve kloroform içerisinde gerçekleştirilmiştir. 230 nm'deki azonbenzenin cis formlarının absorpsiyon yoğunluğu ışınlama süresiyle yavaşça artarken, 328 nm'deki azobenzenin trans formlarının absorpsiyon yoğunluğu azalır. Bu, azobenzen kromoforlarının trans-cis arasında fotoizomerizasyonunu belirtmektedir. Asetonytril içerisinde, ışınlama süresiyle $\pi-\pi^*$ (trans hali) geçişlerine karşılık gelen 328 nm'deki pik azalırken, $n-\pi^*$ (cis hali) geçişlerine karşılık gelen 230 nm'deki pik artmaktadır (Şekil 35.a). Kloroform içerisindeki pikler trans hal için 332 nm ve cis hal için 250 nm'dir. (Şekil 35.b).

Şekil 35.a ve Şekil 35.b'de TDAZO'nun fotoizomerizasyon kinetiğine ait ilave şekil verilmiştir. $\ln[(A_0 - A_e)/(A_t - A_e)]$ zamana bağlı olarak doğrusal olması (A_0 , A_t ve A_e 'nin 328 nm'deki absorpsiyonları sırasıyla zaman 0, zaman t and the fotoyatışkın haldir) TDAZO'nun trans-cis arasındaki fotoizomerizasyonunun birinci dereceden kinetiğe uyduğunu göstermektedir. $\ln[(A_0 - A_e)/(A_t - A_e)]$ 'nin zamana karşı grafiğinde eğim, TDAZO'nun trans-cis arasındaki fotoizomerizasyonu için birinci dereceden hız sabitini (k_p) vermektedir. TDAZO'nun dışarıyla DCM ve ACN içerisindeki fotoizomerizasyon hız sabitleri 0.195 ve 0.308'dir.

Şekil 35.c'de ACN içerisinde TDAZO'nun optik absorbansının sıcaklığa bağlılığı gösterilmektedir. Isıtma işlemiyle, cis-trans isomerizasyonu, 230 nm'deki absorpsiyonda bir artışa sebep olurken, 328 nm'deki absorpsiyonda düşüşe yol açmaktadır.

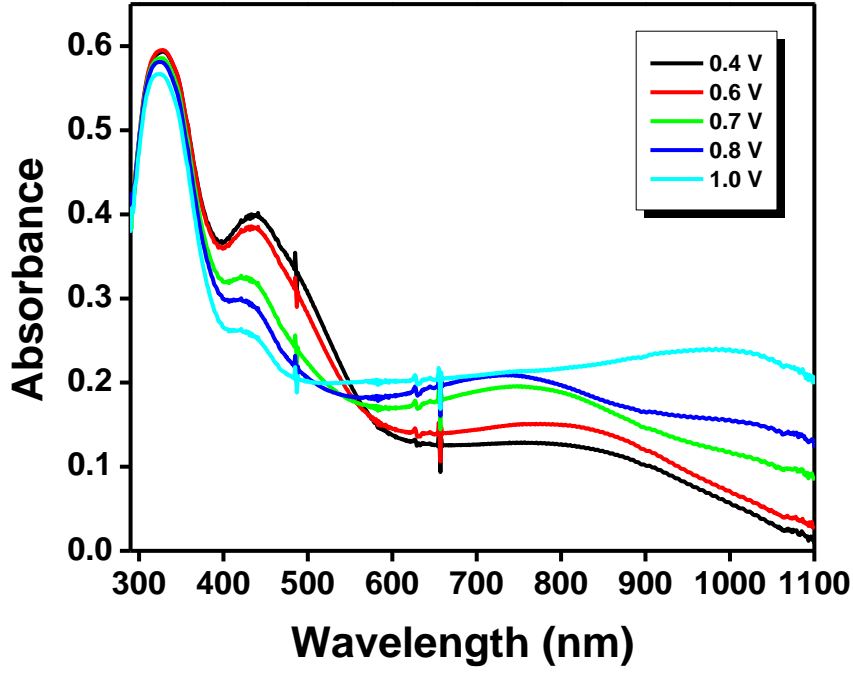




Şekil 37. 25 °C'de 360 nm ışık uyarılması ile TDAZO'nun a) ACN ve b) DCM çözücüsü içerisindeki UV spektrumları. İç grafikler ise birinci derece trans-cis izomerizasyon kinetiğini göstermektedir. c) TDAZO'nun termo duyarlılık özelliğini göstermektedir.

3.3.5 P(TDAZO-co-Th)'nin Spektroelektrokimyası

Spektroelektrokimyasal deneyler, iletken polimerlerin bant aralığı (E_g) ve doping gibi önemli özelliklerini ortaya çıkarmaktadır. Polimer filmi, 1.8 V'da AN içerisinde Th ve TBAFB varlığında TDAZO (0.01 M)'nin potansiyostatik elektrokimyasal kopolimerizasyonu ile ITO üzerinde biriktirilmiştir. +0.4 V ve +1.0 V arasında geçiş yaparak monomer içermeyen elektrolitik sistemin spektrokimyasal deneyleri yapılmıştır (Şekil 36). $\pi-\pi^*$ geçişlerine ait (elektronik bant boşluğu) enerji başlangıcı 1.95 eV ve λ_{max} 439 nm olarak bulunmuştur. 720 nm çevresindeki pik görünümü, polaron band oluşumundan kaynaklanmaktadır. İleri yükseltgenmelerde farklı bir absorpsiyon görünümü bipolaron yapıdaki taşıyıcı değişimleri nedeniyle (~1000 nm) uzun dalga boylarında görülmektedir. 328 nm'de diazo gruplarına ait absorpsiyon açıkça görülebilmektedir.



Şekil 38. P(TDAZO-co-Th) için Spektroelektrokimya Grafiği

3.3.6 İmmobilize Edilmiş Enzimlerin Kinetik Parametreleri

Lineweaver-Burk grafiğinden maximum reaksiyon hızı, V_{max} , Michaelis-Menten sabiti ve K_m elde edilmiştir. Enzim bir matris içerisinde tutuklandığından dolayı, reaksiyon hızında ani bir düşüş gözlenmektedir. P(TDAZO-co-Py) matrisi serbest invertazdan daha küçük bir K_m değerini gösterir. Serbest enzimden daha küçük bir K_m değeri, çözelti içerisinde uygun birden fazla mikroortamın matrise yararlı olduğunu göstermektedir. Serbest ve immobilize edilmiş invertaze için kinetic parametreler Tablo 3'de gösterilmektedir.

Tablo 3. Serbest ve immobilize edilmiş invertazın kinetic parametreleri

	K_m	V_{max}
	mM	($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$) protein
Serbest invertaz	26.0	82.3
PPy/invertaz	58.0	3.0
Kopolimer/invertaz	23.0	1.8

3.3.7 Enzim Aktivitesine pH Etkisi

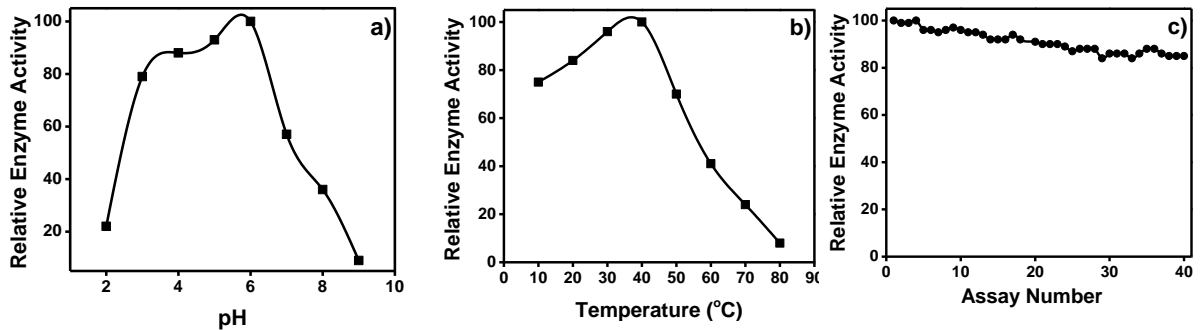
Denatürasyona sebebiyle pH değişiminin etkisi enzim yapısı üzerinde önem kazanmaktadır. Serbest enzim için maksimum aktivite pH 4.6 da elde edilmiştir. P(TDAZO-co-Py) için maksimum pH 6 da bulunmuştur (Şekil 26a) Serbest enzim ile karşılaştırıldığında, matris içindeki dopant iyonlarının varlığından dolayı optimum pH değerinin alkalın tarafına doğru kayığı görülmüştür. Kopolimer matris pH 3-5 gibi düşük pH larda yüksek stabilite vermiştir. Dolayısıyla kopolimer matris enzim reaksiyonları için düşük pH değerlerinde güvenle kullanılabilir.

3.3.8 Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

10-80°C arasındaki sıcaklıkların enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmış ve Şekil 26b de gösterilmiştir. Serbest enzim için maksimum sıcaklık 50°C bulunmuştur. Matris için maksimum enzim aktivitesi 40°C'dedir. Kopolimer matriksin düşük sıcaklıklarda yüksek stabilite göstermiş olmasına rağmen, yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitesi hızla düşmektedir.

3.3.9 Enzim Elektrodunun Operasyonel Kararlılığı

Elektrotların tekrar kullanılabilirlikleri açısından kararlılıkları tahmin edilmeye çalışılmıştır. 40 ardışık ölçüm alınmış ve kopolimer matriksinde çok küçük dalgalanmalar gözlenmiştir. Sonuçlar Şekil 26c de gözlenmiştir. Enzim aktiviteleri 1 gün içinde 25 ° C'de yapılan 40 deney esnasında hemen hemen sabit kalmıştır.

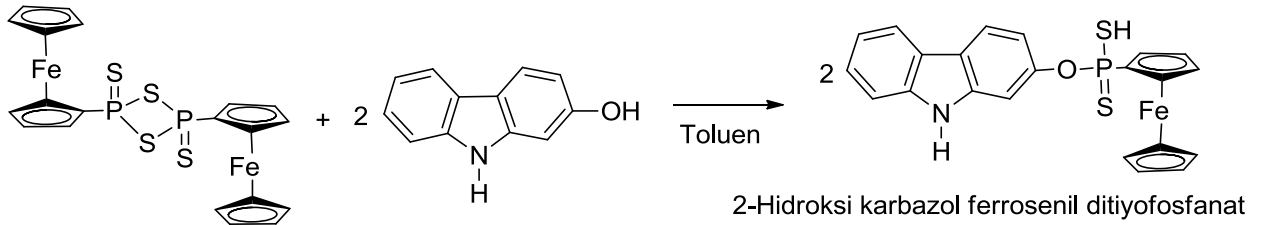


Şekil 39. a) P(TDAZO-co-Py)'a immobilize edilen intervaz aktivitesi üzerinde pH etkisi b) P(TDAZO-co-Py)'a immobilize edilen intervaz aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisi c) P(TDAZO-co-Py)'nun operasyonel stabilitesi

3.4 2-Hidroksi Karbazol Ferrosenil Ditiyofosfanat (Cz-Fc)

3.4.1 2-Hidroksi Karbazol Ferrosenil Ditiyofosfanat (Cz-Fc) Sentezi ve Elektrokimyasal Özellikleri

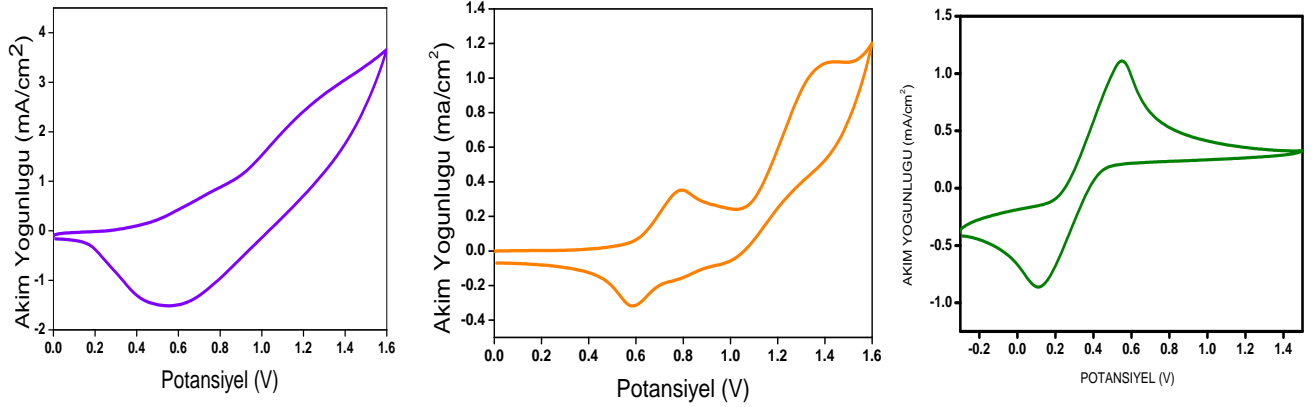
Geri soğutucu takılmış bir balona 0.76 g $[\text{FcPS}(\mu\text{-S})_2]$ konulduktan sonra üzerine 20 mL toluen ilave edildi. Bu karışıma 0.53g 2-hidroksikarbazol ilave edilerek katı madde kalmayınca kadar ısıtıldı. Kahverenginde bir çözelti elde edildi. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra süzüldü. $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 saat soğutuldu ve üzerine 1 mL t-butil amin ilave edildi. $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletildi ve 1 gün sonra çökmeye başladı. Çözeltiye 20 mL n-hekzan ilave edildi ve 1 gün içinde çökmeye başladı. Daha sonra süzüldü ve katı madde 3-4 kez n-hekzan ile yıkandı. Açık havada kurutuldu. % 34 verimle 2-Hidroksi Karbazol Ferrosenil Ditiyofosfanat (Cz-Fc) sentezlendi. Sentez şeması Şekil 40' da verilmiştir.



Şekil 40. 2-Hidroksi Karbazol Ferrosenil Ditiyofosfanat (Cz-Fc) Sentezi

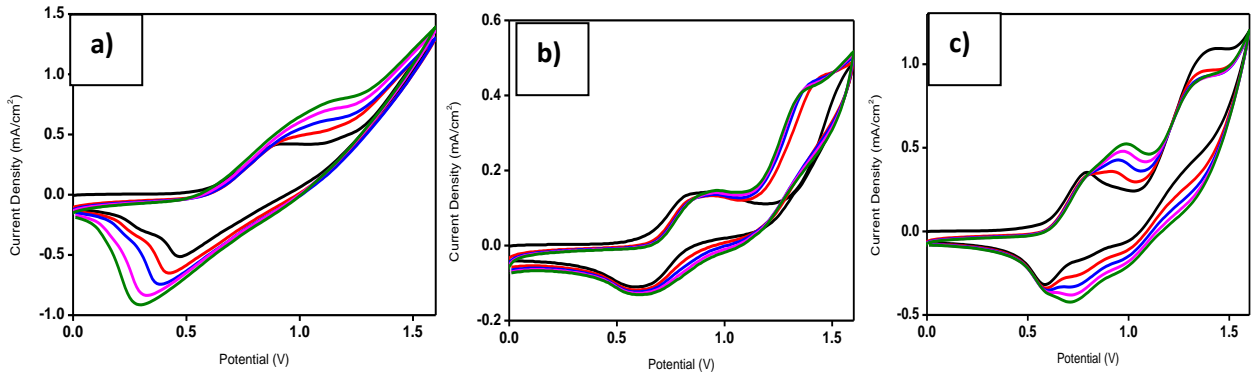
Şekil 41'de sırasıyla, 2-Hidroksi karbazol (Cz), 2-Hidroksi karbazol ferrosenil ditiyofosfat (Cz-Fc) ve ferrosenin LiClO_4 içeren Asetonitril çözeltisi içerisinde 250 mV/s tarama hızıyla alınan dönüşümlü voltametri grafikleri karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

Bu grafikler incelendiğinde Cz-Fc'nin ferrosenin redoks pikine benzer özellik taşıyan bir redoks pik içermesi yapısında ferrosen olduğunu ve bu piklerin ferrosenin redoks pik değerlerinden farklı olması sebebiyle de ferrosenin yapıya bağlanmış olduğunu göstermektedir.



Şekil 41. Sırasıyla, 2-Hidroksi karbazol (Cz), 2-Hidroksi karbazol ferrosenil ditiyofosfat(Cz-Fc) ve ferrosenin CV Grafikleri

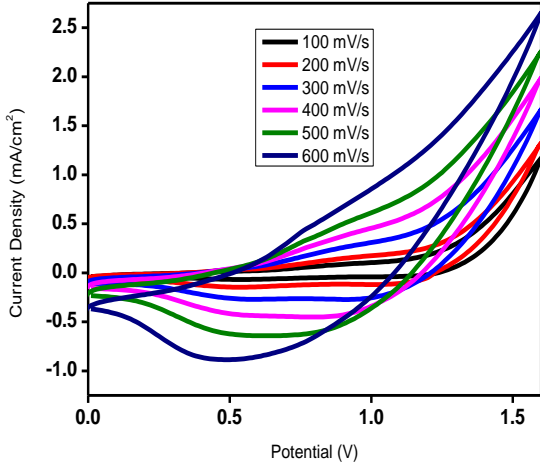
Cz-Fc için farklı çözücülerde dönüşümlü voltametri grafikleri alınmış ve en uygun çözücüye karar verilmiştir. Sırasıyla polikarbonot (PC), diklorometan(DCM) ve asetonitril (ACN) çözücülerinin destek elektrolit olarak tetra bütül amonyum hekza floro fosfat(TBAPF₆)'ın kullanıldığı sistemlere 0V- 1.6V arasında potansiyel uygulanmış ve CV grafikleri karşılaştırılmıştır. (Şekil 42) En iyi sonucun ACN- (TBAPF₆) sisteminde gözlemlendiği görülmüş diğer çalışmalara bu sistemle devam edilmiştir.



Şekil 42. Cz-Fc için a) PC b) DCM c) ACN içindeki CV Grafikleri

P(Cz-Fc), nin sabit potansiyelde filmi hazırlanarak monomer içermeyen elektrolitik çözeltide farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri alınmıştır. Şekil 43'te belirtilen polimerlerin farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarını gösterilmektedir. Tarama hızı arttıkça akım değerlerinin arttığı gözlenmektedir. Akım değerlerinin tarama hızlarıyla doğru

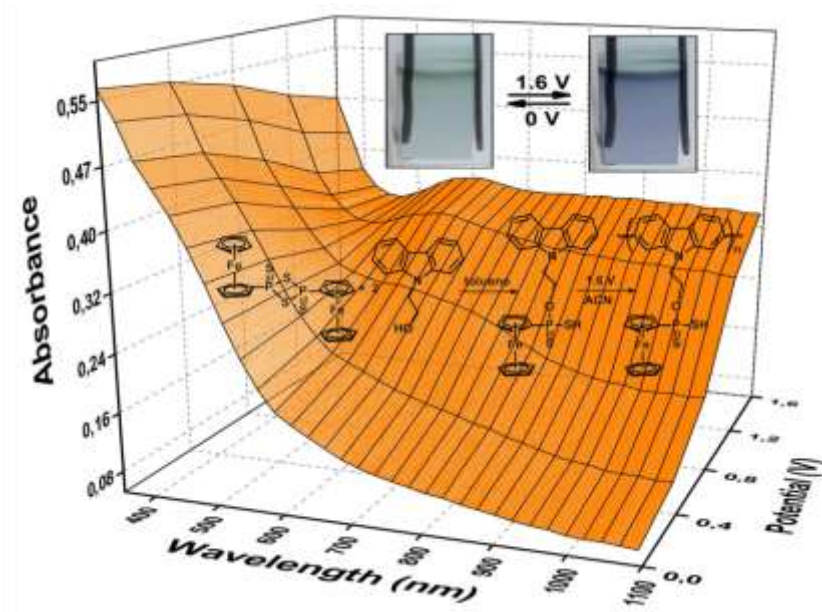
orantılı olması polimer filmlerin elektroaktif olduğunu ve elektroda iyi bağlandığını göstermektedir.



Şekil 43. Cz-Fc için farklı tarama hızlarında karşılaştırılan CV Grafiği

3.4.2 Cz-Fc' e Ait Spektroelektrokimyasal Çalışmalar

Bu çalışmada P(Cz-Fc) filmi ACN- (TBAPF₆) elektrolit sisteminde ITO elektrot üzerinde 1,6 V sabit potansiyel uygulanarak elektrokimyasal olarak sentezlenmiştir. ACN- (TBAPF₆) çözücü sisteminde farklı potansiyellerde UV-spektrumları alınmış, π - π^* geçişlerine ait maksimum dalga boyları (λ_{max}) ölçülmüş ve renk değişimleri kaydedilmiştir.

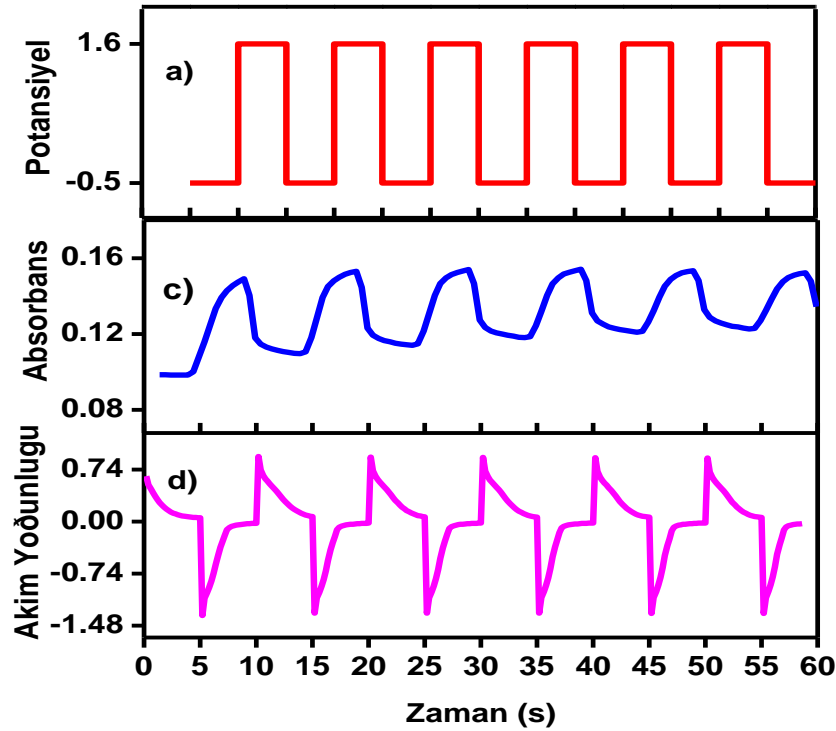


Şekil 44. Cz-Fc nin UV-Vis Spektrumu

P(Cz-Fc)'nin spektroelektrokimya grafiğinden P(Cz-Fc)'nin π - π^* geçişlerine ait maksimum dalga boyu (λ_{max}) 600 nm olarak ölçülmüştür. Bu polimere ait redoks renkleri ise açık yeşil ve mavi olarak gözlenmiştir.

3.4.3 P(Cz-Fc)'ye Ait Tepki Zamanı

Maksimum kontrast elde edilen dalga boyu olan 600 nm de ve polimerin indirgenme ve yükseltgenme potansiyelleri olan -0.5V +1.6 V arasında 5 saniyede bir potansiyel verilmiştir. Şekil 45'te Potansiyel, absorptans ve akım grafikleri çizilmiştir.

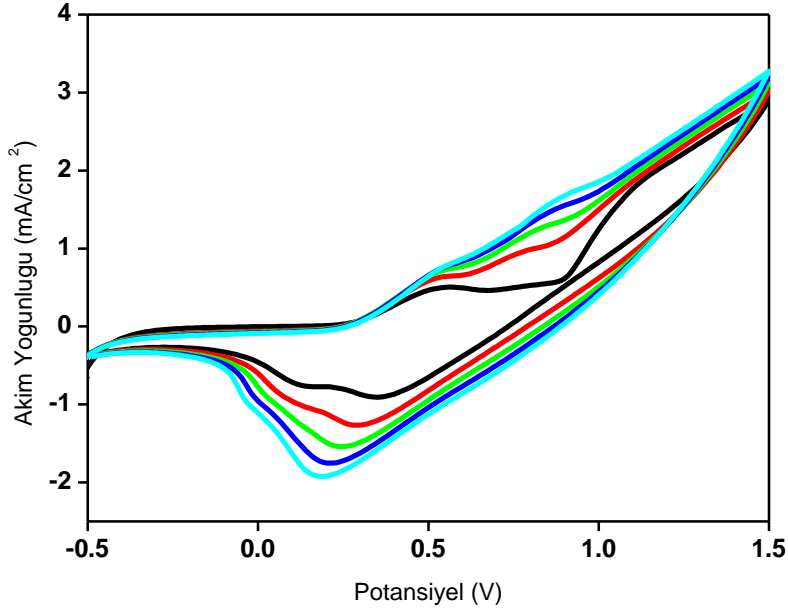


Şekil 45. P(Cz-Fc) için a) Potansiyel-Zaman c) 600 nm için Absorptans-Zaman d) Akım-Zaman Grafikleri

3.4.4 Cz-Fc'nin BFEE Destek Elektrolit Varlığında Elektrokimyasal Özellikleri

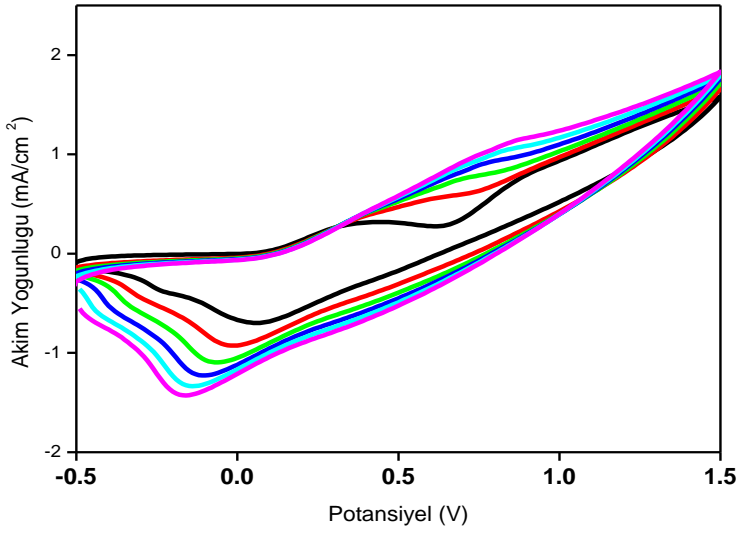
Cz-Fc maddesine yapılan çalışmalardan sonra P(Cz-Fc) filmi bor triflorid dietil eterat (BFEE) içinde Cz-Fc'nin doğrudan yükseltgenmesiyle elektrokimyasal olarak sentezlenmiştir. Bu şartlar altında BFEE sadece çözücü olarak kullanılmamış aynı zamanda destek elektrolit olarak kullanılmıştır. BFEE'nin polimerleşmeye etkisini incelemek amacıyla sırasıyla 1/2 ACN+1/2 BFEE ve tamamen BFEE sistemleri içinde dönüşümlü voltametri ve UV spektrumları incelenmiştir.

1/2 ACN+1/2 BFEE için -0.5 V ile 1.5 V arasında dönüşümlü voltametri grafiği çizilmiştir.



Şekil 46. 1/2 ACN+1/2 BFEE içinde P(Cz-Fc) CV si

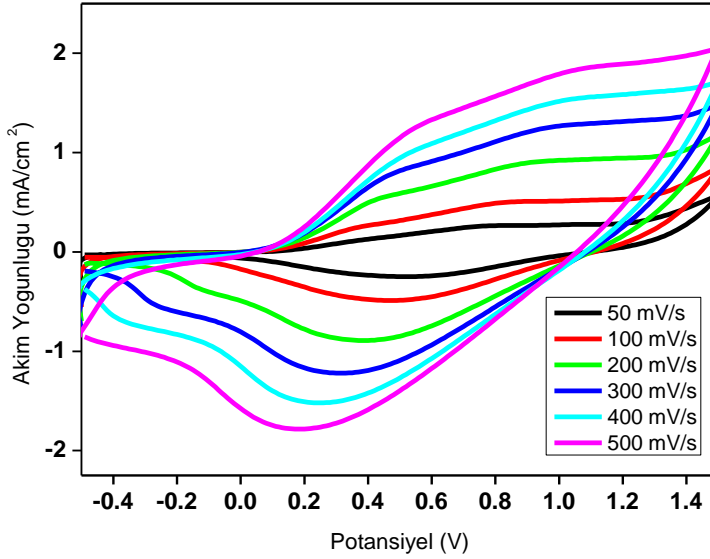
Tamamen BFEE içinde -0.5 V ile 1.5 V arasında dönüşümlü voltametri grafiği çizilmiştir.



Şekil 47. BFEE içinde Cz-Fc için CV grafiği

3.4.5 P(Cz-Fc)' e Ait Tarama Hızına Bağlı Pik Akım Değerleri

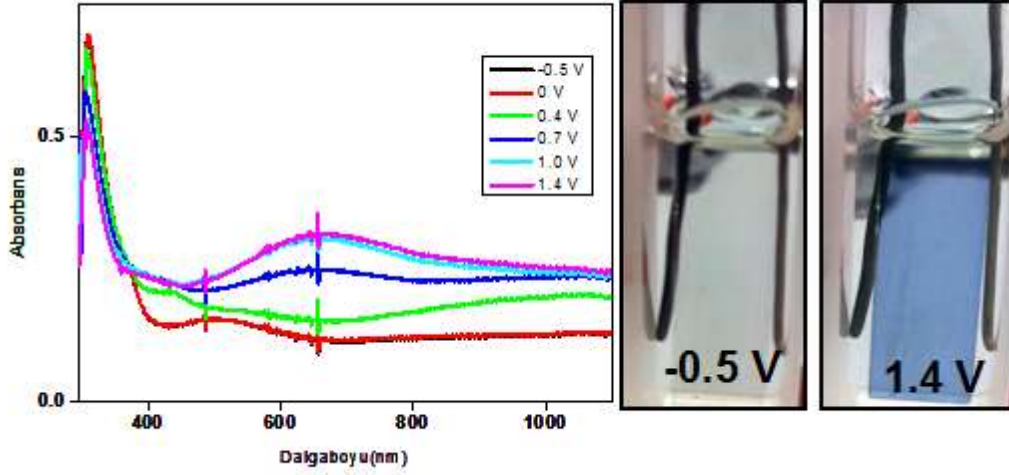
P(Cz-Fc) 'nin BFEE içinde 1,5 V sabit potansiyelde filmi hazırlanarak monomer içermeyen elektrolitik çözeltide farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametrileri alınmıştır. Artan tarama hızlarına karşılık verilen akım cevabının da giderek arttığı gözlenmektedir.



Şekil 48. BFEE içinde CZ-Fc için farklı tarama hızlarındaki CV grafiği

3.4.6 Cz-Fc'nin BFEE Destek Elektrolit Varlığında Spektroelektrokimyasal Özellikleri

Bu çalışmada P(Cz-Fc) filmi BFEE içinde ITO elektrot üzerinde 1,5 V sabit potansiyel uygulanarak elektrokimyasal olarak sentezlenmiştir. Farklı potansiyellerde UV-spektrumları alınmış, π - π^* geçişlerine ait maksimum dalga boyları (λ_{max}) ölçülmüş ve renk değişimi kaydedilmiştir.

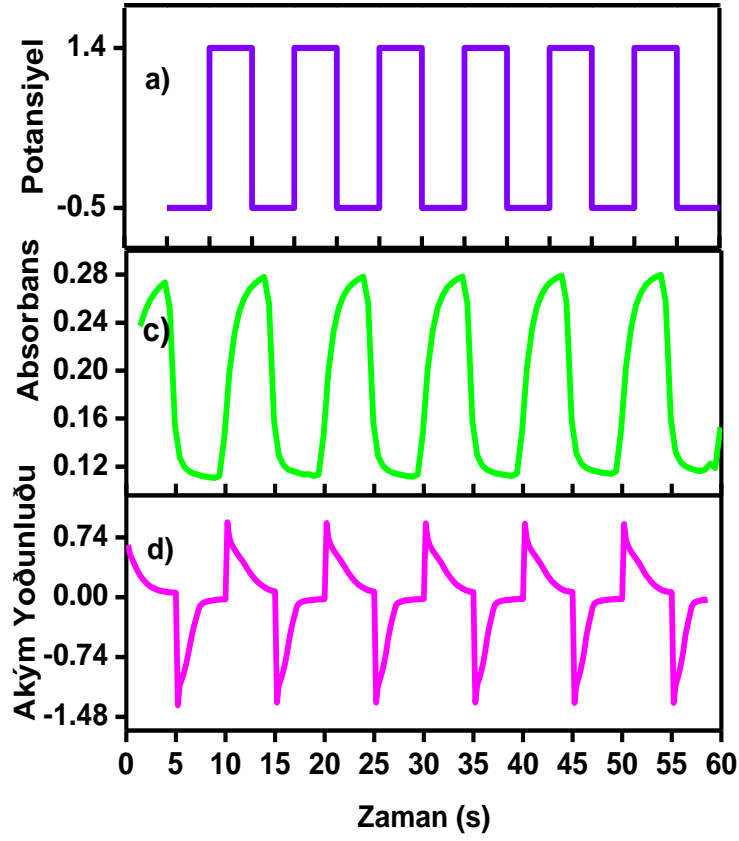


Şekil 49. BFEE içinde P(Cz-Fc)'nin Spektroelektrokimya Grafiği

Şekil 60 da gösterilen P(Cz-Fc)'nin spektroelektrokimya grafiğinden, P(Cz-Fc) π - π^* geçişlerine ait maksimum dalga boyu (λ_{max}) 670 nm olarak ölçülmüştür. Bu polimere ait redoks renkleri ise transparent ve mavi olarak gözlenmiştir.

3.4.7 P(Cz-Fc) İçin Tepki Zamanı

P(Cz-Fc) için maksimum kontrast elde edilen dalga boyu olan 670 nm'de ve polimerin indirgenme ve yükseltgenme potansiyelleri olan -0.5V +1.4V arasında 5 saniyede bir potansiyel verilmiştir ve Şekil 50'de zamana karşı çizilen potansiyel, absorbans ve akım grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 50. P(Cz-Fc) için a) Potansiyel-Zaman c) 670 nm için Absorbans-Zaman d) Akım-Zaman Grafikleri



3.5 2-bütil-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]dioksosino[6,7-b]kinoksalin (BuDQP)

3.5.1 2-bütil-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]dioksosino[6,7-b]kinoksalin Sentezi

Monomerin sentezine ait şema Şekil 51' de gösterilmektedir. Detaylı sentez prodesürü aşağıdaki gibidir;

Dietil N-bütil iminodiaseta (1): İlk olarak 200 mL' lik balon içerisine, n-bütilamine (4.24 g, 5.75 mL, 58 mmol, d:0.74 g/mL) ve kuru K₂CO₃(24.9 g, 180 mmol) eklenerek üzerine susuz asetonitril ilave edildi ve çözelti oda sıcaklığında, homojen reaksiyon ortamı sağlamak için 10 dakika da nitrojen atmosferi altında karıştırıldı. Daha sonra etilkloro asetat (13.4 g, 11.7 mL, 110mmol, d: 1.145g/mL) 9 saat boyunca reflaks edilecek olan karışıma 1 saatlik periyotla damla damla eklendi. Reaksiyon TLC analizi ile kontrol edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, K₂CO₃ filtrelendi ve asetonitril ortamdan uzaklaştırıldı. Sonrasında kalan madde destillenerek saflaştırıldı ve yeşil renkli sıvı halde 12,9 g (85%) dietil N-butil iminodiasetat (bp: 230-235 °C/ 100-150mmHg) elde edildi.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 0,85 (t, J=8,1 Hz, 3H, butyl -CH₃), 1,2 (t, J= 7,1 Hz, 3H, ester -CH₃), 1,25 (sexlet, J=7,3 Hz, 2H, butyl -CH₂), 1,4 (p, J=6,2 Hz, 2H, butyl -CH₂), 2,65 (t, J=8,0 Hz, CH₂, N-CH₂), 3,5 (t, 2H), 4,1 (q, J=6,1 Hz, 2H, ester -CH₂).

MS (EI)m/z (%) calcd. for C₁₂H₂₃NO₄: 245.3; found: 245.2(M⁺, 6), 202(6.3), 172(100), 154(2), 144(3), 130(30), 116(6), 98 (5), 88(3.5), 59(7), 42(15), 29(5.4).

IR (KBr), ν_{max}/cm⁻¹: 2982-2874(alifatik C-H), 1747(ester, C=O), 1467, 1376, 1190 (ester, C-O-C gerilmesi), 1031 (C-N-C gerilmesi), 976, 917.

Dietil 1-bütil-3,4-dihidrooksirol-2,5-dikarboksilat (2): Öncelikle 200 mL' lik balona temiz Sodyum metali (1.61g, 70 mmol) ve 30 mL susuz etanol eklenerek nitrojen atmosferi altında karıştırıldı. Reaksiyon sıcak su banyosunda 75-80°C' de karıştırıldı ve dietil N-bütil iminodiasetat(1) (7.36 g, 30mmol) ve dietil oksalat (4.38 g, 4 mL, 30 mmol, d: 1.076 g/mL) karışımı balon içerisine damla damla eklendi. Reaksiyonun hızlıca sarı-kahve haline geldiği görüldü ve 4 saatlik reflaksın sonunda sarı katı parçaları elde edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra yaklaşık 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Karışım buz banyosunun içerisine dökülerek, glasiyal asetik asit ile yaklaşık pH~5 olacak şekilde asidik hale getirildi. Oluşan katılar metanol ile kristallendirilerek filtrasyon ve saflaştırma yoluyla ayrıldı ve ürün elde edildi. (beyaz katı halde 6.75 g (75%) dietil 1-butyl-3,4-dihidroksipirol-2,5-dikarboksilat (m.p: 58-60 °C))



$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm: 0,9 (t, $J=7,2$ Hz, 3H, butyl $-\text{CH}_3$), 1,3 (sexlet, $J=8,0$ Hz, 2H, butyl $-\text{CH}_2$), 1,4 (t, $J=6,8$ Hz, 3H, ester $-\text{CH}_3$), 1,6 (p, $J=7,6$ Hz, 2H, butyl $-\text{CH}_2$), 4,4 (q, $J=7,2$ Hz, 2H, ester $-\text{CH}_2$), 4,5 (t, $J=7,8$ Hz, 2H, N- CH_2), 7,8 (s, 1H, $-\text{OH}$).

MS (EI)m/z (%) calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_6$: 299.3;found: 299 (M^+ , 28), 253 (100), 223 (1,5), 207 (60), 197 (4), 179 (18), 163,9 (94), 150,9 (14), 138 (2), 96 (1,5), 83 (1,8), 69 (4), 57 (5), 44 (78), 28 (22).

IR (ATR), $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3337, 3248 (O-H stretching), 2984-2864 (z, alifatik C-H gerilmesi), 1676,1641 (ester, C=O gerilmesi), 1467-1305 (alifatik C-H bağı), 1262-1126 (ester,C-O-C ssimetrik ve asimetrik gerilme), 1023 (C-N-C gerilme), 911, 871, 767, 695.

Elemental analiz: anal. calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_6$ (299.3): C 56.18 H 7.07 N 4.68; bulgu: C 55.80 H 6.87 N 4.59.

1,4-Dibromo-2,3-butandion (3): 250 mL' lik balon içerisinde 2,3-bütandion (10 g; 116 mmol) ve 20 mL CHCl_3 konuldu. Bromin (37g, 12mL, 232 mmol, d: 3,1028 g/mL) 25 mL CHCl_3 ile seyreltilerek damla damla reaksiyon karışımına eklendi. Sonrasında reaksiyon 50°C ' de HBr üretilmeden devam ettirildi ve karışım buzdolabında gece boyunca soğutuldu. Çökelti filter edildi ve sarı katı elde edildi. Sonrasında ham madde 1,4-dibromo-2,3-butandion CHCl_3 ile kristallendirilerek elde edildi.(23 g (82%) (m.p: 116°C))

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm: 4.30 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{Br}$).

Elemental analysis: anal. calcd. for $\text{C}_4\text{H}_4\text{Br}_2\text{O}_2$ (243.9): C 19.70 H 1.65 found: C 18.86 H 1.50.

2,3-Bis(bromometil)kinoksalin (4): o-fenilendiamin (3 g, 22 mmol) 5 mL etanolda çözülerek balon içersine konuldu. Başka bir balonda 1,4-dibromo-2,3-butandion (3) (6.4g, 22 mmol) 5 mL etanol içerisinde çözüldü. Her iki karışım yavaşça karıştırılarak buz banyosunda 1 saat boyunca karıştırıldı. Karışım gece boyunca buzdolabında soğutulduktan sonra çöktürülmüş 2,3-bis(bromometil)kinoksalin (6.3 g) 82% verimle açık kahverengi toz halinde elde edildi. (m.p: 150°C).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm: 4.9 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{Br}$), 7.8 (d, 2H, arom.), 8.1 (d, 2H, arom.).

IR (ATR), $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3019 (aromatik, C-H gerilme), 2978-2901 (alifatik, C-H gerilme), 1456 (alifatik C-H bağı), 764 (ş, aromatik, C-H bağı).

Elemental analiz: anal. calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{Br}_2\text{N}_2$ (316): C 38.01 H 2.55 N 8.87; found: C 36.95 H 2.32 N 7.94.



Dietil-2-butil-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]dioksokino[6,7-b]

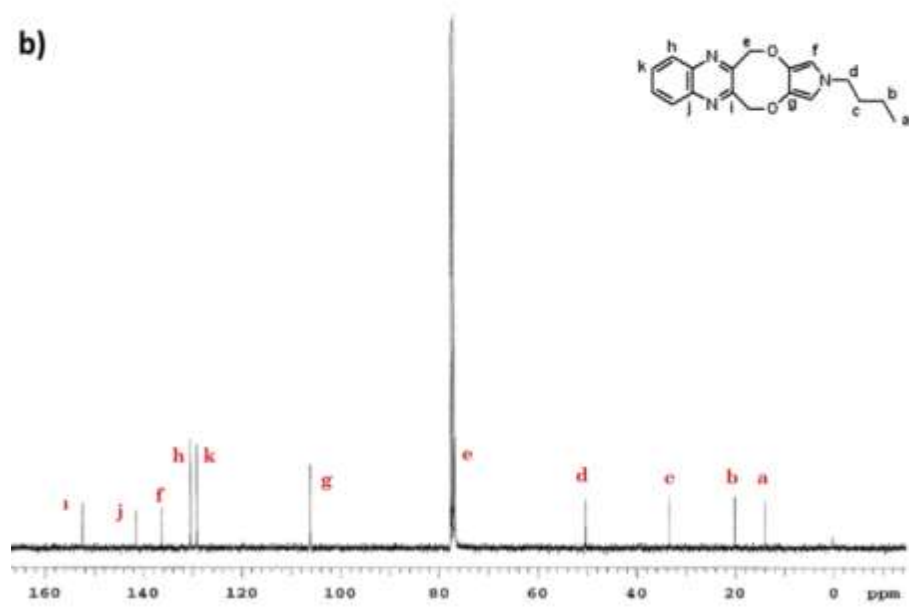
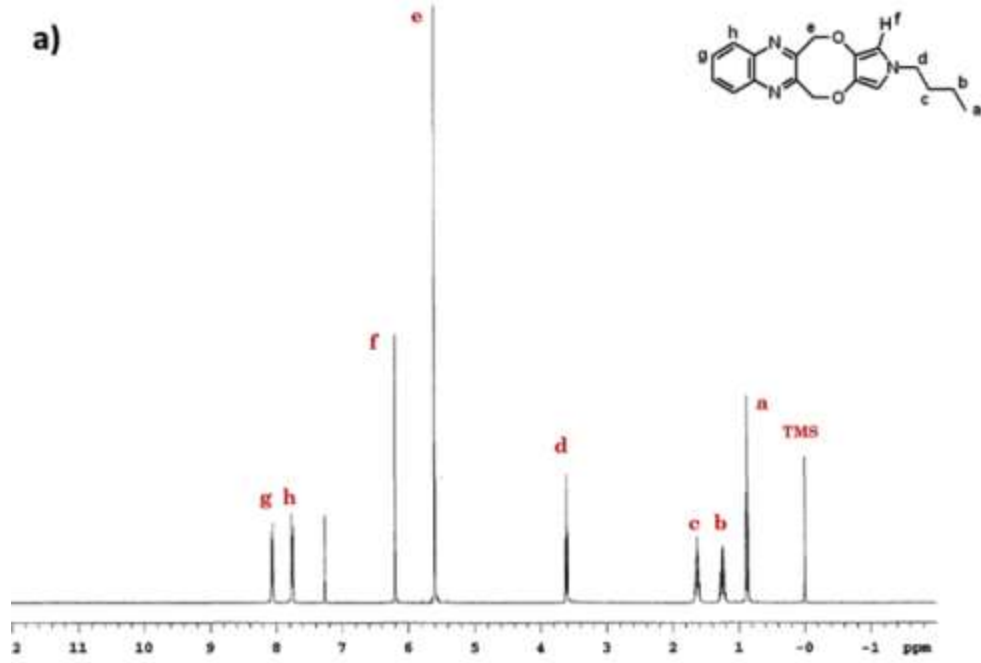
kinoksalin-1,3-dikarboksilat (5): Dietil 1-butil-3,4-dihidroksirol-2,5-dikarboksilat (2) (0.9 g, 3 mmol) 15 mL susuz DMF içerisinde çözülüp nitrojen atmosferi altında balon içerisine konulup geri soğutuculu düzenek altında reaksiyon başlatıldı. Kuru K_2CO_3 (1.24g, 9 mmol) ve 2,3-bis(bromometil) kinoksalin (0.95 g, 3 mmol) çözelti içerisine eklendi ve karışım $100^\circ C$ ' de 6 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım 100 mL buzlu su içerisine alındı ve ham ürün filter edilerek ayrıldı ve sonra bir kez 25 mL su ile ve iki kez 0.1 N potasyum hidroksit çözeltisiyle yıkandı. Dietil eterden kristallendirilerek kahverengi katı ürün dietil-2-butil-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]dioksokino[6,7-b]kinoksalin-1,3-dikarboksilat 1.2 g, %88 verimle elde edildi (m.p: $145-147^\circ C$).

2-Butil-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]dioksosino[6,7-b]kinoksalin-1,3-dikarboksilik asit (6): Diethyl-2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrol[3',4':2,3][1,4]dioxosino[6,7-b]kinoksalin-1,3-dikarboksilat (5) (0.91 g, 2 mmol) ve 15 mL etanol geri soğutuculu düzenek altında bir balon içerisine eklendi. Üzerine 1mL saf su ve KOH (85%, 0.4 g, 6 mmol) eklendikten sonra, karışım sıcak su banyosunda 5 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra fazla bulunan etanol atmosfer basıncında distile edilerek çözeltilerden uzaklaştırıldı ve sonra balonda kalan madde buzlu su içerisine döküldü ve soğuyan sulu faz derişik HCl (pH~2-3) ile asidik hale getirildi. Elde edilen krem rengi ürün filtrasyon ile ayrılarak grit oz halinde 2-Butil-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]dioksosino[6,7-b]kinoksalin-1,3-dikarboksilik asit 0.76 g (95%) elde edildi (m.p: $199^\circ C$).

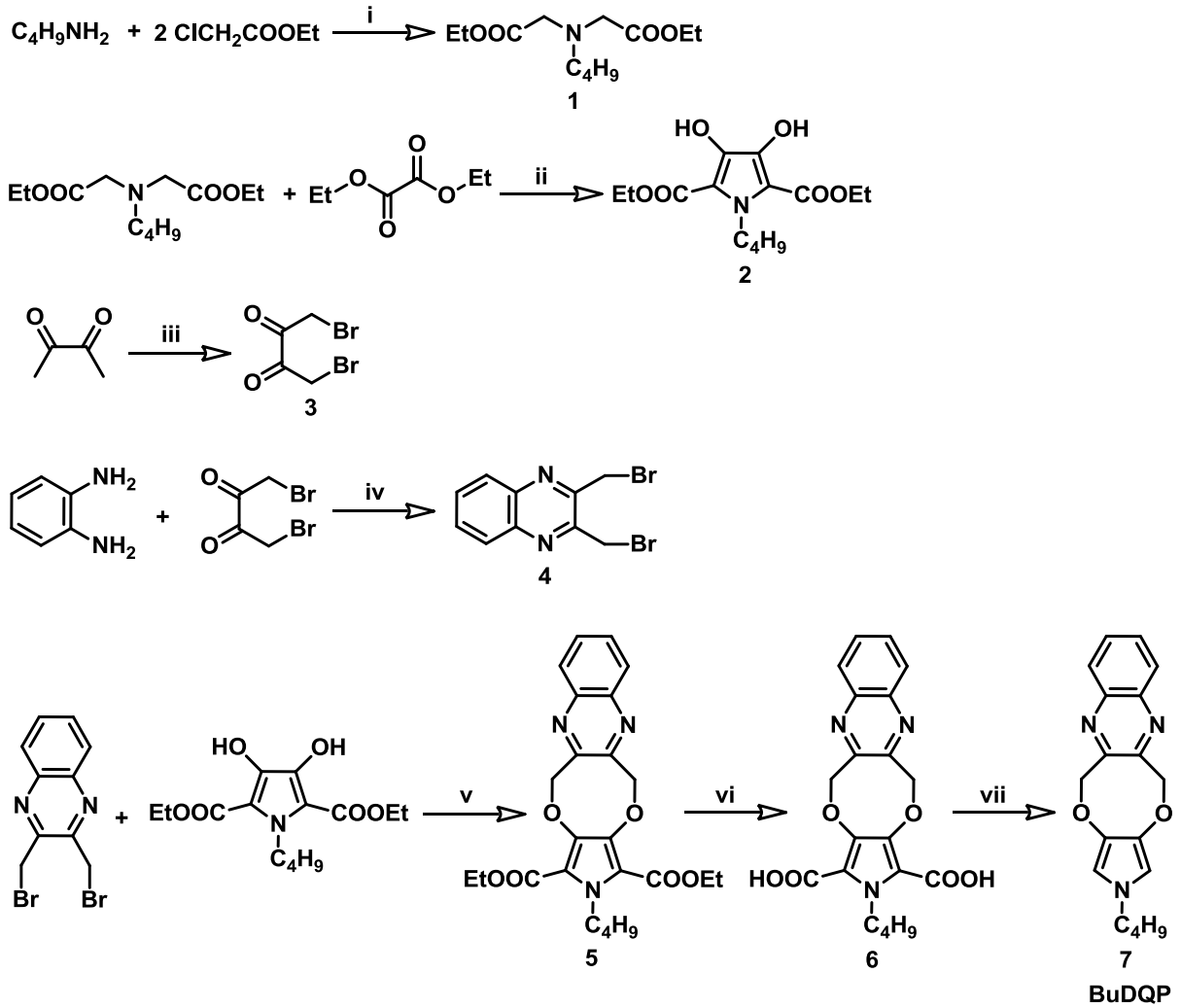
2-Butil-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]dioksosino[6,7-b]kinoksalin (7): Dikarboksilik asit türevleri ; Butil-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]dioksosino[6,7-b]kinoksalin-1,3-dikarboksilik asit (6) (0.225 g, 0.57 mmol) ve 5 mL trietanolamin nitrojen gazı altında yağ banyosunda $130^\circ C$ ' de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Balon oda sıcaklığına geldiği zaman, karışım buzlu su içerisine döküldü. Ürün diklorometan ile ekstrakte edilip, tuzlu su ve sui le yıkandı. DCM uzaklaştırıldıktan sonra organik faz susuz sodyum sülfat üzerinde kurutuldu.

Ham madde kolon kromatografisiyle saflaştırılarak (SiO_2 , CH_2Cl_2 /Hekzan, 1:1, v/v) açık sarı renkli katı 2-Butil-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]dioksosino[6,7-b]kinoksalin (0.114 g) %65 verimle elde edildi.

Sentezlenen monomere ait H^1 -NMR ve C^{13} -NMR spektrumları aşağıda verilmiştir. Spektrumlardan da anlaşılabilceği gibi monomer kimyasal yapısındaki proton ve karbon atomlarının spektrumlardaki pik değerleri yapıyı doğrulamaktadır.



Şekil 51. a) BuDQP'in $^1\text{H-NMR}$ b) $^{13}\text{C-NMR}$ spekturumu

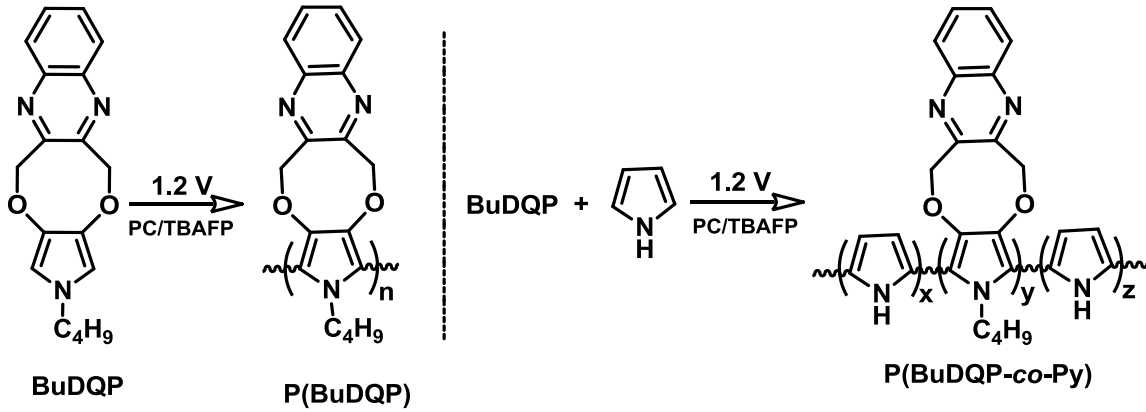


Şekil52. BuDQP' in sentez şeması,koşullar: (i) K₂CO₃, ACN, reflux, 9 h, 85%; (ii) 1, NaOEt (yenihazırlanmış Na çözeltisi ve EtOH N₂ atmosferi altında), EtOH, 0°C, dietilokzalat, 6 h, AcOH (pH~5), 75%; (iii) Br₂, CHCl₃, 45oC, 82%; (iv) EtOH, 0oC, 1 h, 82%; (v) K₂CO₃, DMF, reflux, 6 h, 88%; (vi) KOH, EtOH, 5 h, 95%; (vii) trietanolamin, 130oC, 1 h, 65%.

3.5.2 2-bütül-5,12-dihidro-2H-pirol[3',4':2,3][1,4]diokso[6,7-b]kinoksalin'in Pirol(Py) ile kopolimerleştirilmesi

0.01 M BUDQP ile 0.05 M TBAFP PC içinde çözüldü ve daha önce detayları verilen 3 elektrotlu hücreye konularak elektroliz yapıldı. P(BDQP) ITO üzerine 1.2 V potansiyelde kaplandı. Kaplama işleminden sonra polimer filmi reaksiyona girmeden kalan monomer varlığından dolayı birkaç kez PC ile yıkandı. Elektrokromik çalışmalar, spektroelektrokimyasal çalışmalar ve switching çalışmaları monomer yokluğundaki ortamda çalışılmıştır.

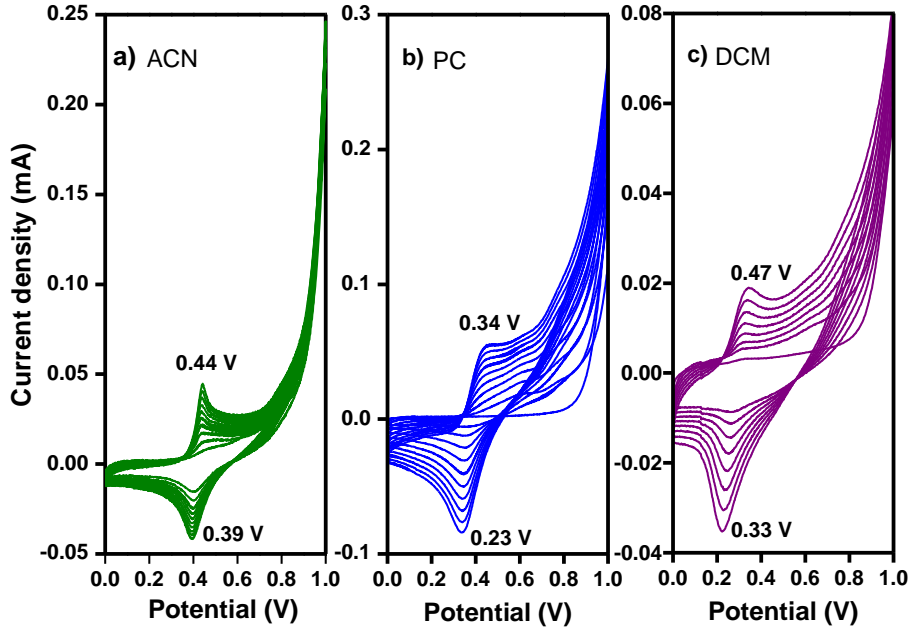
QP'nin iletken kopolimer sentezi için komonomer olarak Piro (Py) kullanıldı. Monomer komonomer oranı (Py:QP) 1:4 olacak şekilde seçildi. QP 10 mL PC içerisinde çözülerek elektrot hücresinin içerisine konuldu ve içerisine Py (2,5mM) eklendi. İnert ortamda 10 dakika boyunca 1.2 V sabit potansiyelde kopolimerleştirme gerçekleştirildi.



Şekil 53. P(BuDQP) ve P(BuDQP-co-Py)'ün elektrokimyasal sentez şeması

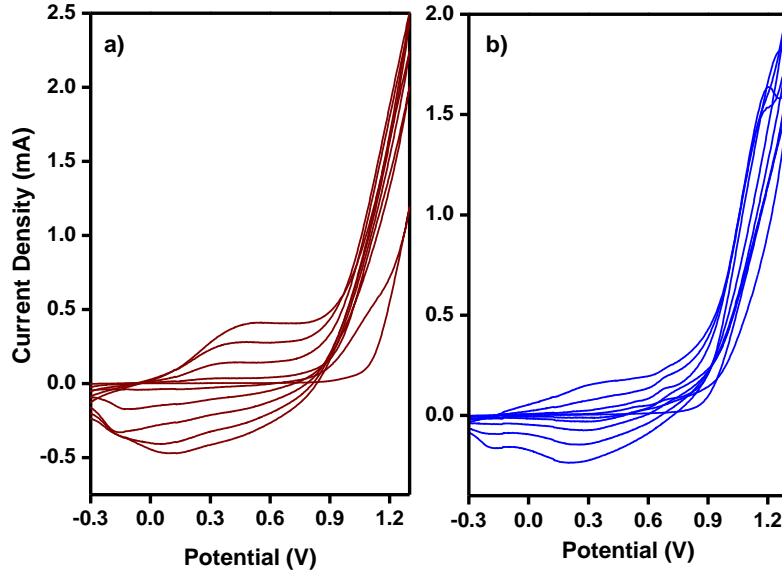
3.5.3 BuDQP'a ait Dönüşümlü Voltametri Grafikleri

0.01 M BuDQP daha önce belirtilen elektrot hücresi kullanılarak farklı çözücüler içerisinde (DCM, ACN ve PC) 0.05 M TBAFP destek elektroliti kullanılarak inert ortamda polimerleştirilmiştir. Polimerizasyon boyunca, elektroaktif polimer filmi elektrot yüzeyine kaplanmıştır. BuDQP' un farklı çözücüler içerisinde indirgenme ve yükseltgenme pikleri ve buna ait dönüşümlü voltamogramlar Şekil 54 'te verilmiştir.



Şekil 54. BuDQP'ın a) ACN b) PC ve c) DCM içerisindeki indirgenme ve yükseltgenme pikleri ve dönüşümlü voltametrileri

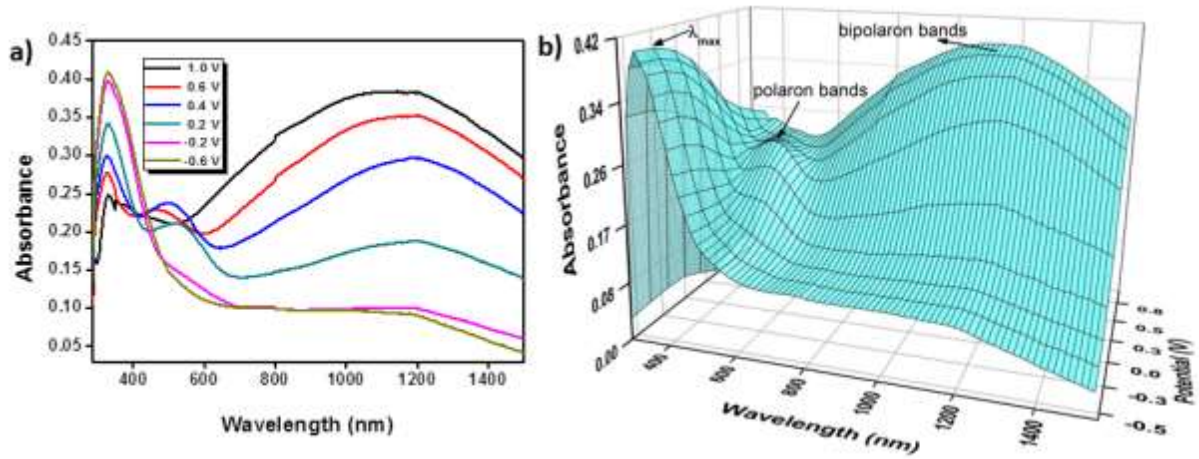
BuDQP' a ait kopolimerin elektroaktivitesini araştırmak için Py varlığında dönüşümlü voltametri çalışmaları yapılmıştır. 0.01 M BuDQP 10mL PC içerisinde çözülmüş ve içerisine 2.5 Mm Py eklenerek elektrokimyasal çalışmaları yapılmıştır. Destek elektrolit olarak TBAFP kullanılmıştır. Üçlü elektrot sistemi kullanılarak kopolimerleştirme gerçekleştirilmiş ve kopolimer ile pirolün dönüşümlü voltametrileri alınmıştır. (Şekil 55)



Şekil 55. a) Saf pirol ve b) P(BuDQP-co-Py)' e ait Dönüşümlü Voltamogramlar

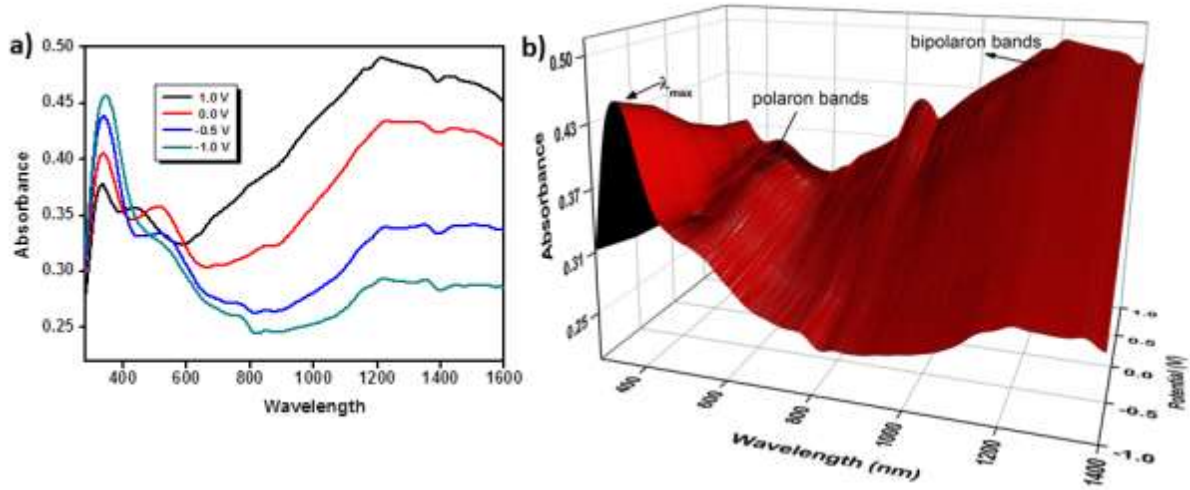
3.5.4 P(BuDQP) ve P(BuDQP-co-Py)' e ait Spektroelektrokimyasal Çalışmalar

P(BuDQP) filmi DCM/TBP₆ çözücü elektrolit sisteminde ITO elektrot üzerinde elektrokimyasal olarak sentezlenmiştir. P(BuDQP)'nin spektrokimyasal çalışmaları -0.6 ve +1.0 V arasında monomersiz PC/TBAFP çözücü sisteminde gerçekleştirilmiştir. π - π^* geçişleri maksimum dalga boyunun (λ_{max}) 328 nm olduğunu gözlenmiş ve band aralığı 2,30 eV olarak hesaplanmıştır (Şekil 56). Ayrıca polaron bandlarının oluşumundan kaynaklanan yaklaşık 500 nm' de bir pik artışı gözlenmiştir.



Şekil 56. P(BuDQP) filmine ait (a) 2D ve (b) 3D spektrokimyasal grafikleri

Kopolimer P (BuDQP-co-Py)'ün ve spektroeletrokimya davranışlarını incelemek için, TBAFP/PC varlığında -1.0 ile 1.0 V arasında ITO cam yüzeyine polimer filmi kaplanmıştır. Spektroeletrokimyasal özellikleri incelemek için aynı ortmada çalışılmış fakat monomer içermeyen çözelti kullanılmıştır. Saf polipirol ve P (BuDQP)' tan önemli ölçüde farklı olan açık bir turuncu renk ortaya çıkmış ve kopolimerin nötr halde $\pi-\pi^*$ geçişleri için λ_{max} değeri 346 nm ve band aralığı 2.24 eV olarak bulunmuştur. Uygulanan potansiyel artışına bağlı olarak 518 nm' de yeni bir absorpsiyon bandı oluştuğu gözlenmiş ve yük taşıyıcıların değişiminde dolayı λ_{max} 'daki band yoğunluğunda kademeli olarak bir azalma gözlenmiştir.(Şekil 57)



Şekil 57. P(BuDQP-co-Py)' e ait (a) 2D ve (b) 3D spektroeletro grafikleri

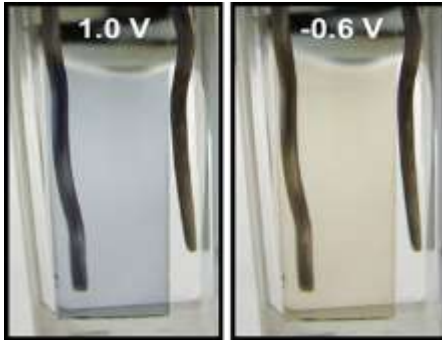
3.5.5 Kolorimetri

Elktrokromik malzemelerin renkleri kolorimetre ölçümleri ile tanımlanmıştır. CIE sistemi renkleri tanımlamak ve karşılaştırmak için bir nicel ölçek olarak kullanılmıştır . Renk (a) , doygunluk (b) ve parlaklık (L) ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Tablo 4'de sonuçlar özetlenmektedir.

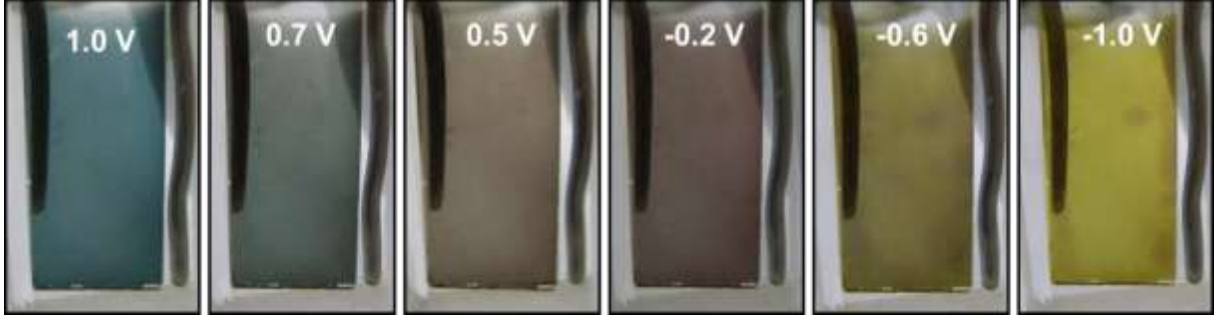
Tablo 4: Polimerlerin elektrokromik ve elektronik özellikleri

Polimer	Potential	Luminesans (L)	Renk (a)	Doygunluk (b)
P(BuDQP)	-0.6 V	85	-4	21
	1.0 V	73	-2	-3
P(BuDQP-co-Py)	-1.0 V	77	-10	60
	-0.6 V	51	-5	33
P(BuDQP-co-Py)	-0.2 V	37	7	4
	0.5 V	46	5	11
	0.7 V	43	-7	2
	1.0 V	39	-11	-4

P(BuDQP) filmi 0 V'indirgendiğinde mavi 1.0 V'da yükseltgendiğinde sarı renk gösterir. Prolün band aralığı yüksektir. Ancak elektrokromik özellikleri düşüktür. Gözlenen gri ve turkuaz renkleri arasında elektrokromik araç yapmak kullanışlı değildir. Bu iki koyu renk arasındaki tepki zamanı düşüktür. Ancak P(BuDQP-co-Py) kopolimeri için -1.0 V ve 1.0 V arasında multielektrokromik özellik gözlenmiştir. 5 farklı renk gözlenmiştir. P(BuDQP) nin redoks renkleri şekil 58'de P(BuDQP-co-Py)'nin redoks renkleri ise şekil 59'da gösterilmiştir.



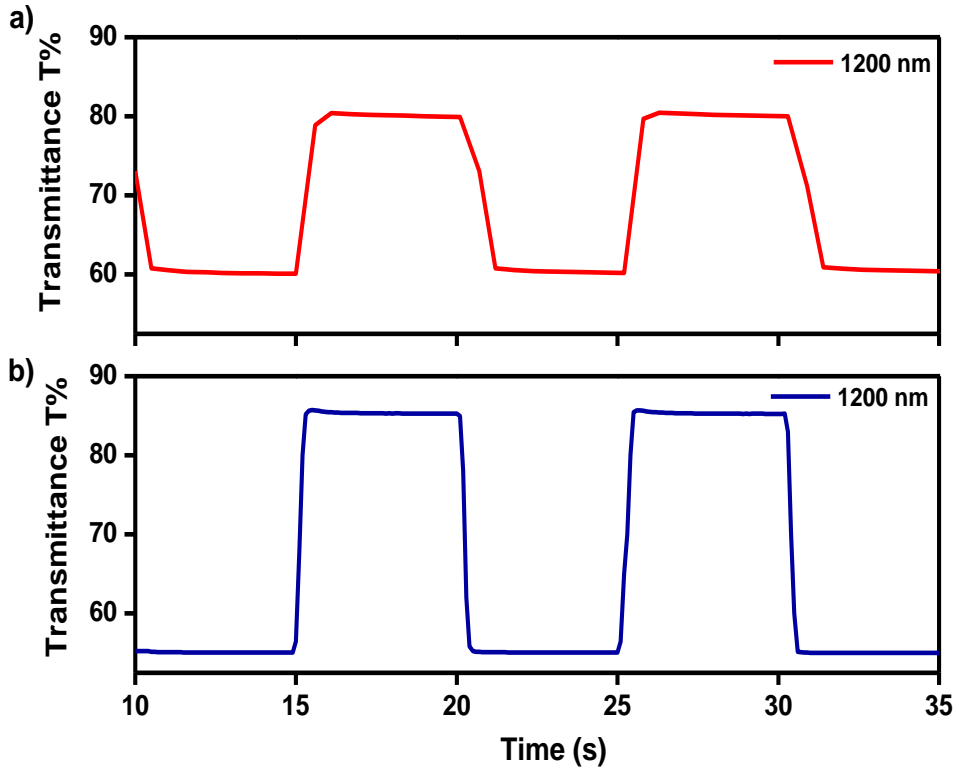
Şekil 58. P(BuDQP)'nin redoks renkleri



Şekil 59. P(BuDQP-co-Py)'nin redoks renkleri

3.5.6 Tepki Zamanı

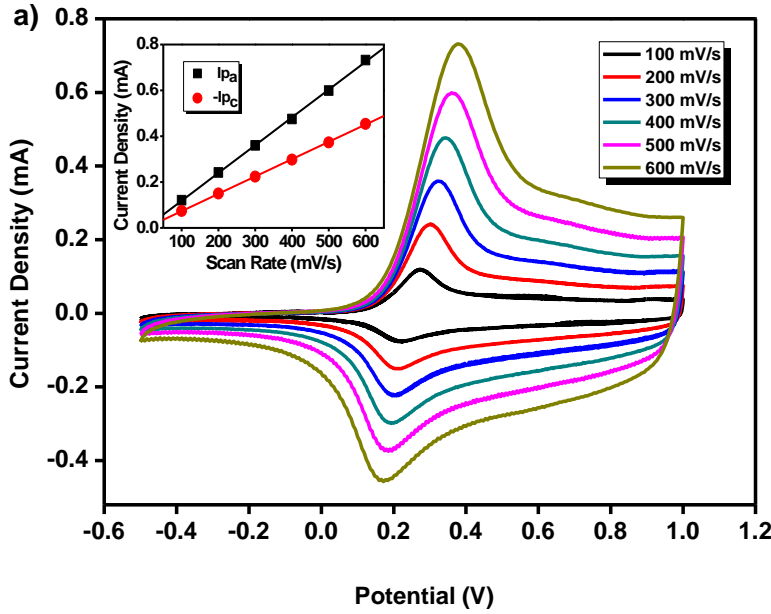
Polimer filmin tamamen oksitlenmiş ve nötral halleri arasında 5 saniyede bir potansiyel verilmiştir. P(BuDQP) ve P(BuDQP-co-Py) için maksimum kontrast elde edilen dalga boylarında polimerin indirgenme ve yükseltgenme potansiyelleri olan -0.6 V +1.0 V arasında 5 saniyede bir potansiyel verilmiştir ve Şekil 60'da zamana karşı çizilen potansiyel, absorpsiyon ve akım grafikleri gösterilmiştir. P(BuDQP) için 1200 nm'de tepki zamanı 0.4s maksimum kontrast %32 iken, P(BuDQP-co-Py) 1200 nm'de tepki zamanı 1,1s maksimum kontrast %21 olarak bulunmuştur.



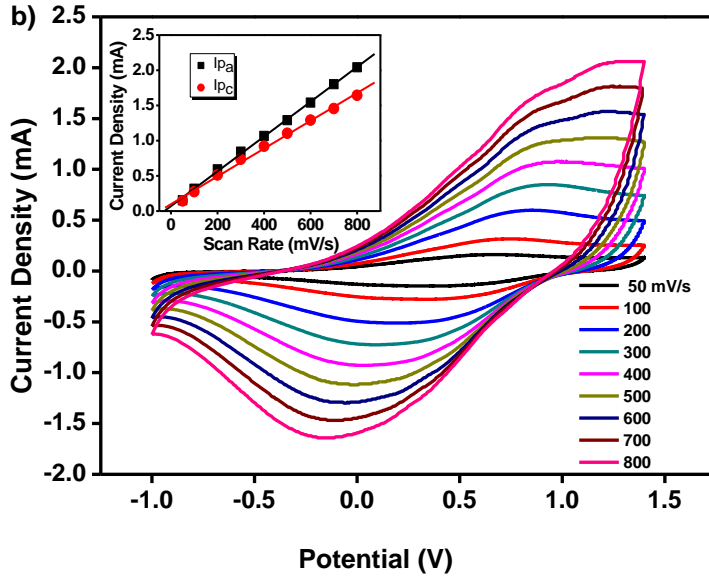
Şekil 60. Elektrokromik tepki zamanı, optic absorpsiyon değişimi a) P(BuDQP) b) P(BuDQP-co-Py)

3.5.7 Tarama hızının polimerleşmeye etkisi

P(BuDQP) ve P(BuDQP-co-Py)'un sabit potansiyelde filmleri hazırlanarak monomer içermeyen elektrolitik çözeltide farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametrileri alınmıştır. Şekil 61 ve Şekil 62' de belirtilen polimerlerin farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarını gösterilmektedir. Akım değerlerinin tarama hızlarıyla doğru orantılı olması polimer filmlerin elektroaktif olduğunu ve elektroda iyi bağlandığını göstermektedir. Şekil 61 ve Şekil 62' de içerisindeki iç grafikte de gösterildiği gibi anodik ve katodik pik akımları tarama hızının bir fonksiyonu olarak doğrusal bağımlılık göstermektedir. Bu sonuçtan yüksek tarama hızlarında bile elektrokimyasal sürecin difüzyonun kontrollü olmadığını ve tersinir bir reaksiyon olduğu kanıtlanmaktadır.



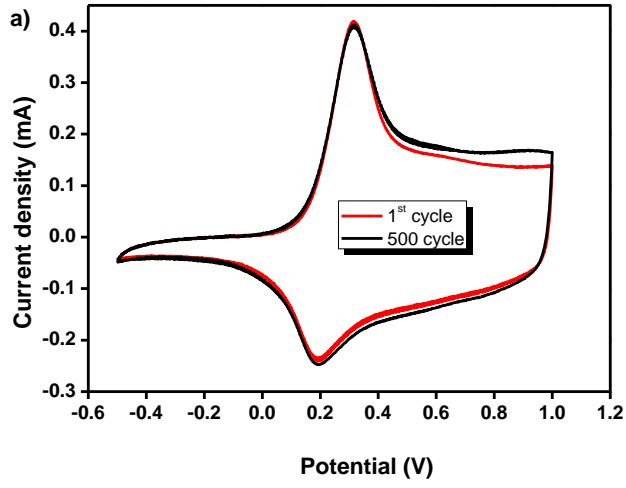
Şekil 61. a) BuDQP'nin farklı tarama hızlarındaki CV grafikleri



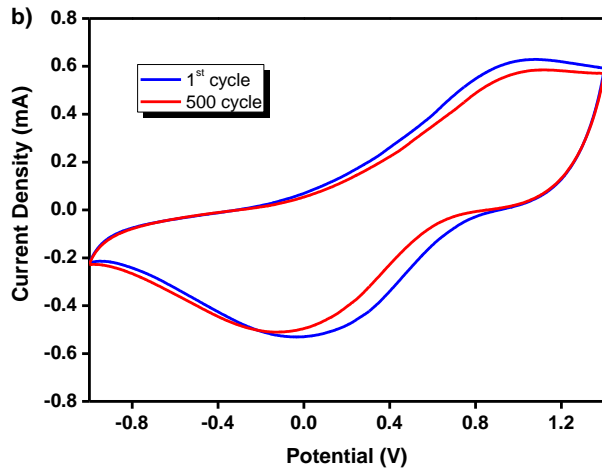
Şekil 62. P(BuDQP-co-Py)'nin farklı tarama hızlarındaki CV grafikleri

3.5.8 Stabilité

Birden çok redoks çevrim sırasındaki elektroaktif polimerlerin zamanla redoks stabilitesinin yitirmesi elektrokromik cihaz uygulamalarındaki elektrokromik malzemelerin kullanımını kısıtlayıcı faktörlerdendir. Elektrokromik malzemelerin redoks stabilitesinin düşüklüğünün başlıca nedenleri yüksek gerilimler ve çevresel koşullardır. Dönüşümlü voltametri iletken polimerlerden uzun vadeli stabilitesinin ölçümünde kullanılabilir. Polimerin kararlılığını test etmek için, P(BuDQP) için 0.0 V ve -2.3 V arasında P(BuDQP-co-Py) için -0.7 V ve +1.3 V arasında 500 mV / sn 'lik bir tarama hızı ile defalarca potansiyel uygulanmıştır. Şekil 63'den anlaşılacağı gibi P(BuDQP)'nin çevresel ve redoks stabilitesinin iyi olduğu gözlenmiştir. Şekil 64'de ise P(BuDQP-co-Py)'nin makul çevresel ve redoks stabilitesine sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 63. P(BuDQP)'nin redoks stabilitesi

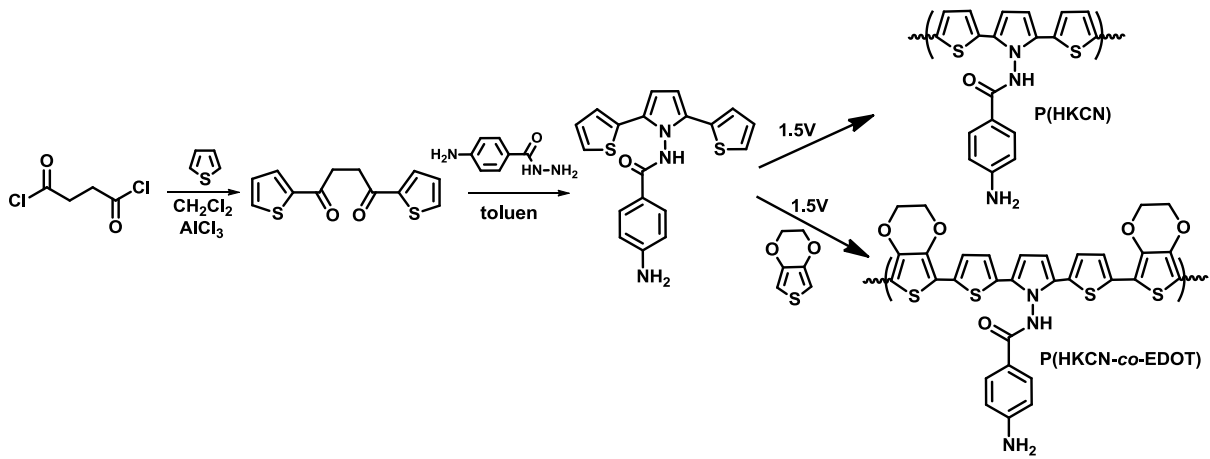


Şekil 64. P(BuDQP-co-Py)'nin redoks stabilitesi

3.6 4-amino-N-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)benzamid (HKCN)

3.6.1 HKCN'nin Sentezi ve Elektrokromik Özellikleri

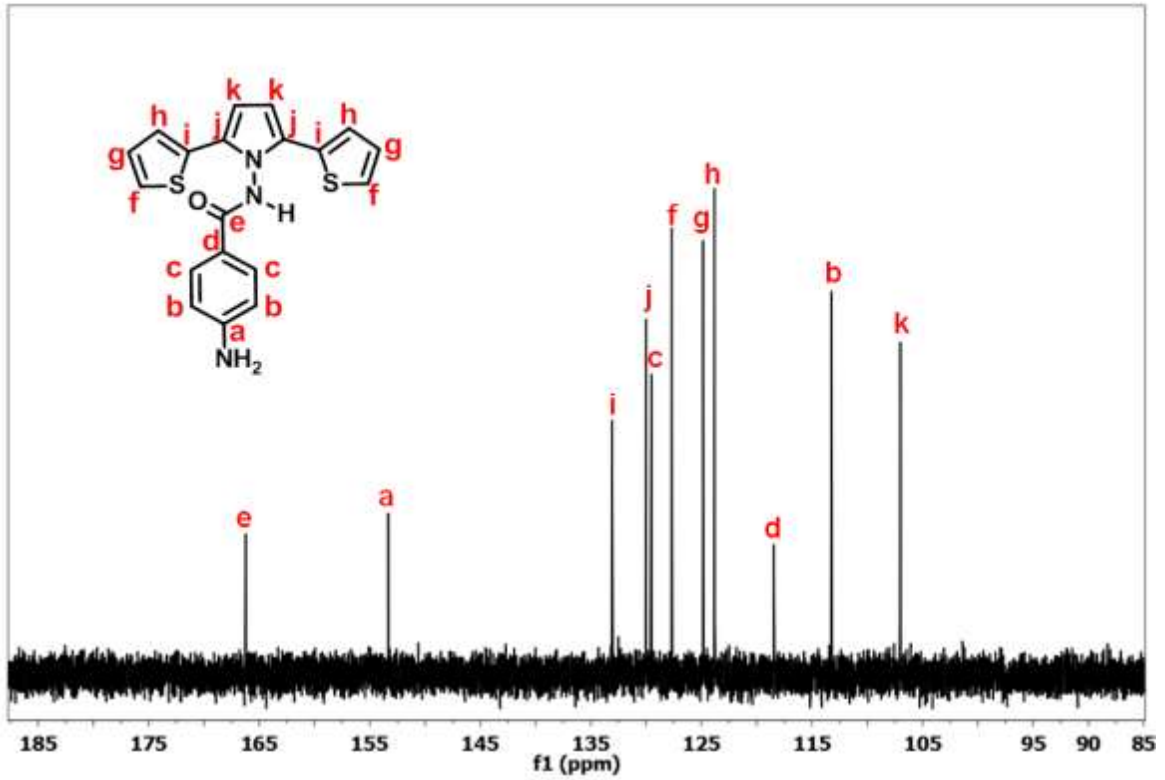
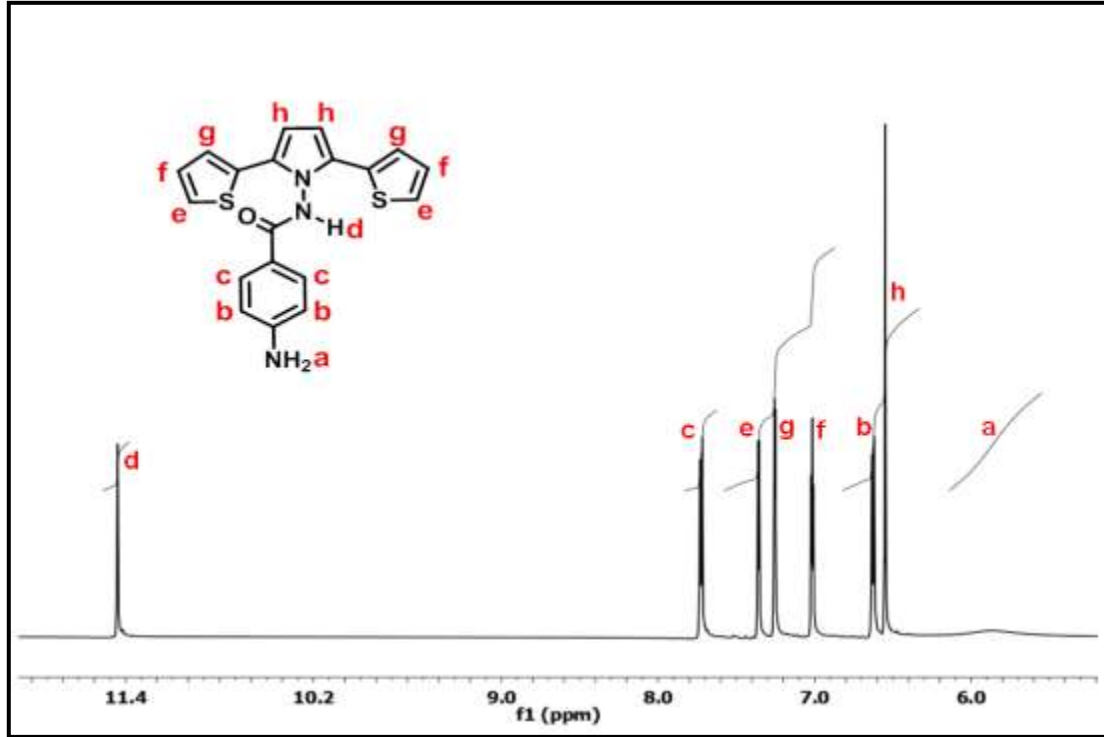
Sentezin ilk basamağında tiyofen ve süksinildiklorür $AlCl_3$ katalizörlüğündeki Friedel Craft reaksiyonu ile 1,4-bis(2-tiyenil)bütan-1,4-dion sentezlenmiştir. Daha sonra katalitik miktarda p-toluen sülfonik asit varlığında 4-aminobenzamid ile reaksiyon sonucunda 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)bütan-1-amin (HKCN) sentezlenmiştir (Şekil 40).



Şekil 65. HKCN, P(HKCN) ve P(HKCN-co-EDOT) sentez şemaları

100 ml'lik balona 16 ml DCM çözücüsü ve $AlCl_3$ (16g, 0,12 mol) konularak damlatma hunisine yardımıyla tiyofen (9.6 ml, 0,12 mol) , süksinil diklorür (5.6 ml ,0.5 mol) ve 10 ml DCM çözücüsü eklendi. Sıcaklık 20 dereceyi geçmeyecek şekilde 4 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Bu sürenin sonunda karışıma 7 ml HCl eklenerek sırasıyla DCM, 2M HCl ve % 5 lik $NaHCO_3$ çözeltileriyle ekstrakte edildi. Çözücünün uzaklaştırılmasından sonra madde etanolde kristallendirilerek % 53 verimle 1,4-bis(2-tiyenil)bütan-1,4-dion sentezlendi.

Sentezlenen monomere ait H^1 -NMR ve C^{13} -NMR spektrumları aşağıda verilmiştir. Spektrumlardan da görülebileceği gibi monomer kimyasal yapısındaki proton ve karbon atomlarının spektrumlardaki pik değerleri yapıyı doğrulamaktadır.



Şekil 66.HKCN monomerine ait ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumu



3.6.2 HKCN'nin EDOT ile Elektrokimyasal Kopolimerizasyonu

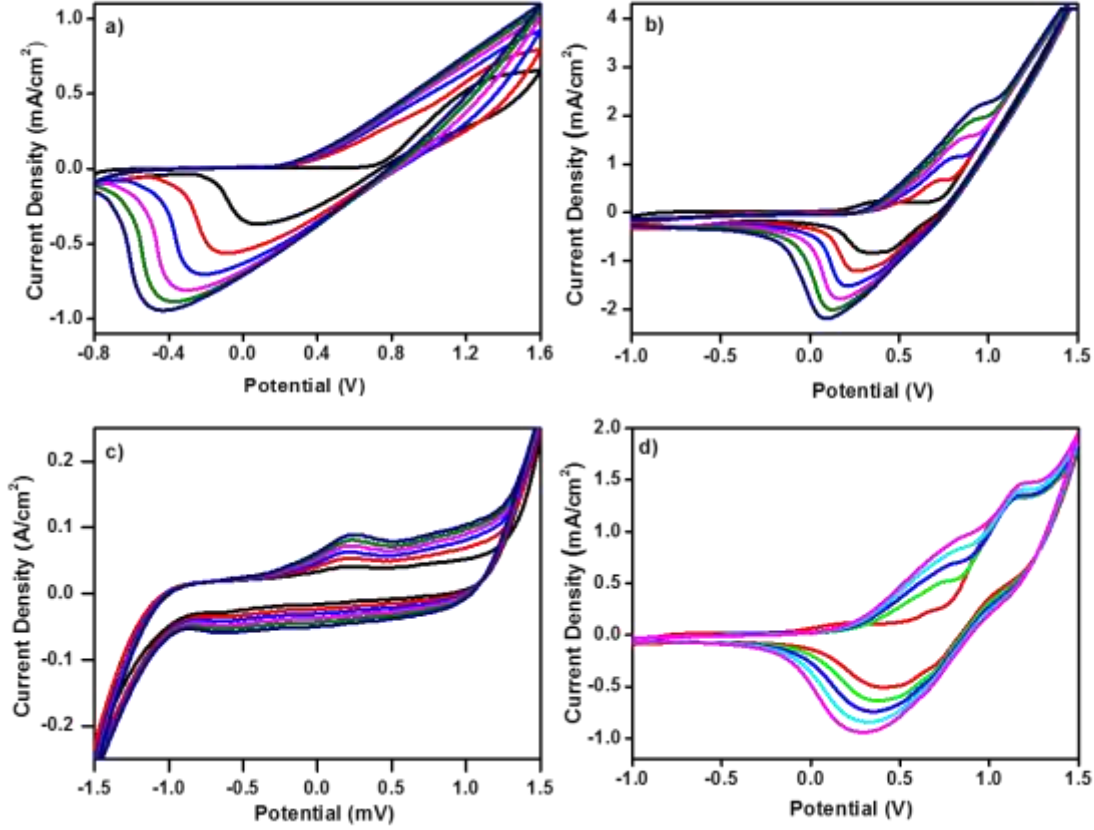
P(HKCN-co-EDOT) iletken polimeri EDOT varlığında sentezlendi (Şekil 3). 1.3×10^{-3} M HKCN 0.1M TBP₆ içeren DCM içinde çözüldü ve 1.3×10^{-3} M EDOT ile birlikte daha önce detayları verilen 3 elektrotlu hücreye konularak elektroliz yapılmıştır. Kopolimer ITO üzerine 1.5 V potansiyelde kaplandı. Farklı besleme oranlarıyla yapılan HKCN ile EDOT'un elektrokimyasal kopolimerizasyon oksidasyonu da 1.5 V potansiyelde yapılmıştır.

3.6.3 Dönüşümlü voltametri

HKCN'nin indirgenme ve yükseltgenme davranışları 0.1 M TBP₆/DCM içinde CV ile araştırılmıştır. Dönüşümlü voltamogramın ilk döngüsünde HKCN 0,75V dan sonra okside olmuştur ve +1,2 V'da yükseltgenme ve -0.37 V da indirgenme piki gözlenmiştir. Artan tarama hızlarında elektroaktivite de artmıştır. Dönüşümlü voltametri boyunca elektrokromizm sarı ve mavi arasında gözlenmiştir. Ancak diğer SNS türevlerinin aksine doğrusal oligomerlerin kısmi çözünmesinden dolayı elektrot etrafında yeşilimsi bulut oluşmamıştır. Sonuçlar ve gözlemler bu yeni SNS türevinin iyi elektroaktivite gösterdiğini ve elektroda daha iyi bağlandığını göstermektedir.

HKCN monomer asetonitril (ACN) içinde tamamen farklı redoks davranışları göstermiştir. HKCN'nin ACN içindeki dönüşümlü voltamogramında monomer DCM içinde olduğu gibi 0.75 V da radikal katyonuna okside olmuştur. Ancak oksidasyon piki gözlenmemiştir. Monomer oksidasyonu oligomerlerin elektroda kimyasal bağlanmasıyla devam eder. Bu oligomerlerin uzamaya devam ederek elektrot yüzeyinde çökeliş polimerin çalışma elektrodu üstünde biriktiği katodik yönde tarama yaparken polimer indirgenme piki 0.36 V da pik vermesinden anlaşılmıştır. İkinci pozitif taramada okitlenmiş polimerden dolayı oksidasyon piki 0.66 V da görülmüştür (Şekil 42a ve Şekil 42b).

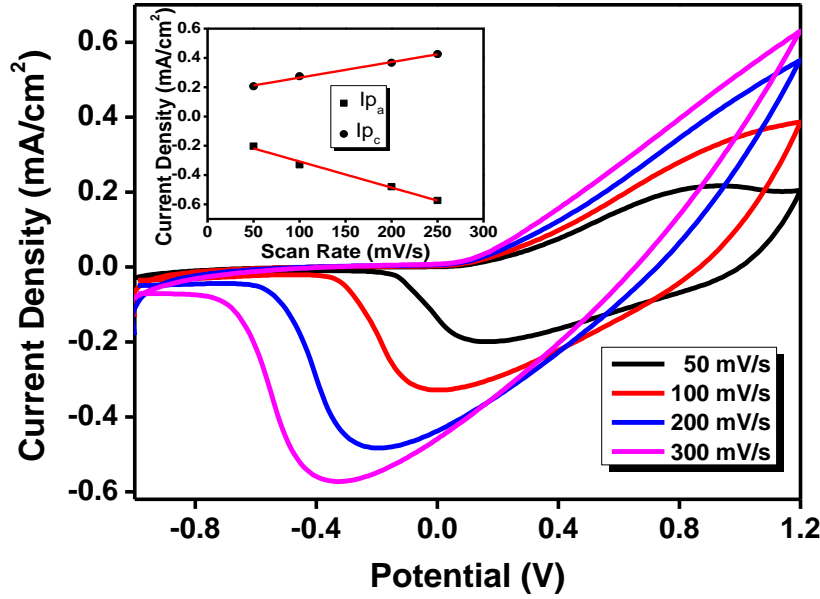
HKCN'ün EDOT ile kopolimerinin elektrokimyasal davranışlarını incelemek için CV çalışmaları DCM içinde aynı deney şartlarında yapılmıştır. Şekil 4'te gösterildiği gibi HKCN (Şekil 42a) ve EDOT'un (Şekil 42c) dönüşümlü voltametri grafikleri hem ardışık döngülerin şekilleri hem de malzemenin redoks potansiyelleri kopolimerin dönüşümlü voltametrisinden büyük farklılık göstermektedir. Bu sonuçlardan kopolimerin başarılı bir şekilde oluşturulduğu sonucu çıkarılabilmektedir.



Şekil 67. a) DCM içerisinde HKCN b) ACN içerisinde HKCN c) EDOT d)DCM içerisinde HKCN ve EDOT Dönüşümlü Voltamogramları

3.6.4 Tarama hızına bağlı pik akım değerleri

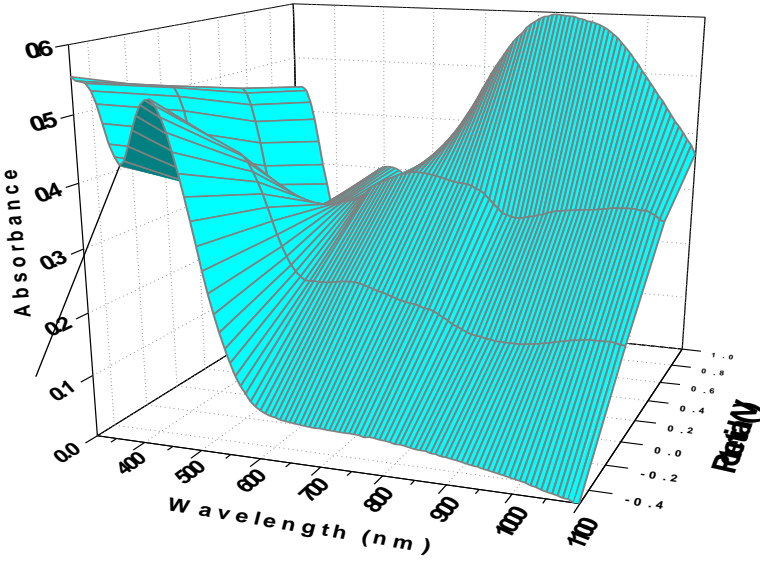
P(HKCN) sabit potansiyelde filmi hazırlanarak monomer içermeyen elektrolit içeren çözeltide farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametrileri alınmıştır. Şekil 4 P(HKCN)' nin farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarını göstermektedir. Alınan akım değerlerinin tarama hızlarıyla doğru orantılı olması polimer filmlerin elektroaktif olduğunu ve elektroda iyi bağlandığını göstermektedir. Şekil 43 içerisindeki iç grafikte de gösterildiği gibi anodik ve katodik pik akımları tarama hızının bir fonksiyonu olarak doğrusal bağımlılık göstermektedir. Bu sonuçtan yüksek tarama hızlarında bile elektrokimyasal sürecin difüzyonun kontrollü olmadığını fakat tersinir bir reaksiyon olduğunu kanıtlanmaktadır.



Şekil 68. P(HKCN) nin DCM/ TBP₆ içinde farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltammogramları. (İç grafik tarama hızına karşı pik akım değerlerini göstermektedir.)

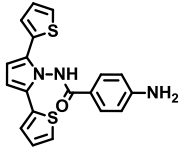
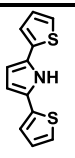
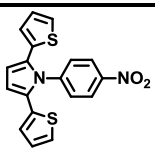
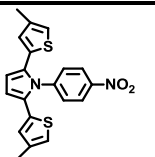
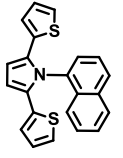
3.6.5 P(HKCN)'nin Elektrokromik Özellikleri

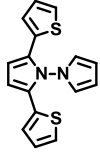
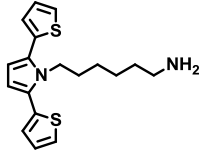
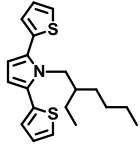
İletken polimerlerin voltaj değişimi üzerindeki optik özelliklerini incelemenin en iyi yolu spektroeletrokimya'dır. Ayrıca bant aralığı (E_g) ve doping gibi polimerin elektronik yapısı hakkında bilgi verir. P(HKCN) filmi DCM/TBP₆ çözücü elektrolit sisteminde ITO elektrot üzerinde elektrokimyasal olarak sentezlenmiştir. P(HKCN) nin spektroeletrokimya çalışmaları 0.0V-1.0V arasında monomersiz DCM/TBP₆ (0.1 M) çözücü sisteminde gerçekleştirilmiştir. $\pi-\pi^*$ geçişleri maksimum dalgaboyunun (λ_{max}) 445 nm olduğunu gözlenmiş ve band aralığı 1.95 eV olarak hesaplanmıştır (Şekil 44). Sonuçlar literatürdeki diğer SNS türevleri ile kıyaslandığında, bu yeni tipi SNS türevinin $\pi-\pi^*$ geçişinde yüksek dalgaboyuna ve düşük band aralığı enerjisine sahip olduğu anlaşılmıştır (Tablo 4). Bilindiği üzere, elektron verici gruplar HOMO enerji düzeyi artırmaktadır. Yapılan incelemeler sonucunda azot atomunun konjuge SNS halkasına sağladığı elektron transferinden dolayı daha düşük band aralıklı polimerin elde edilebildiği sonucunu çıkarmaktayız.



Şekil 69. P(HKCN)'nin Spektroelektrokimya grafiği

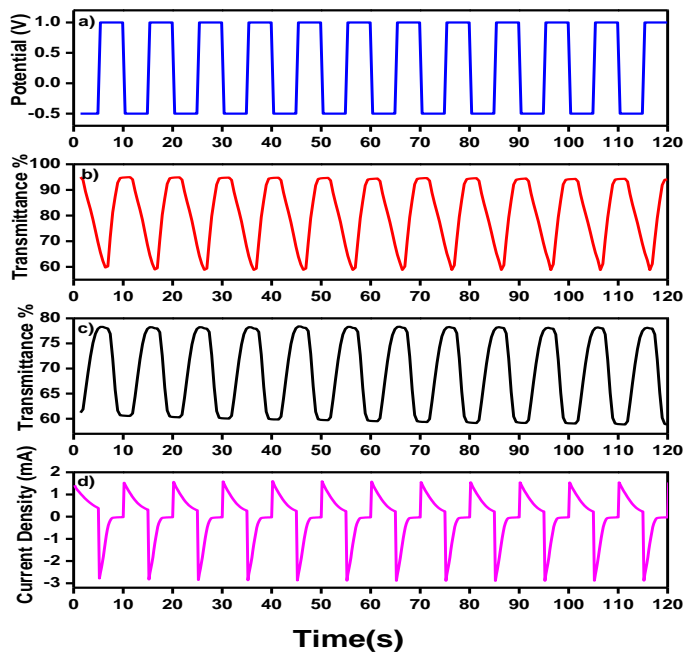
Tablo 5. Benzer SNS türevleri için spektroelektrokimyasal veriler

Structure	λ_{\max}	E_g	% ΔT	Referans
	445	1.95	18 (440nm) 36 (800nm)	Bu çalışma
	430	2.88	-	[1]
	400	2.15	13 (400nm) 23 (800nm)	[2]
	345	2.18	5 (345nm) 15(1050nm)	[3]
	423	2.33	18 (423nm)	[4]

	444	2.21	18 (444nm) 31 (661nm)	[5]
	334	2.27	11 (334)	[6]
	360	2.32	-	[7]

3.6.6 Switching

Hızlı tepki zamanı ve keskin bir renk değişimi yeteneği elektrokromik bir polimer için çok önemlidir. Polimer filmin tepki süresini saptamak için kronoamperometrik çift potansiyel yöntemi uygulanmıştır. Polimer filmin tamamen oksitlenmiş ve nötral halleri arasında 5 saniyede bir potansiyel verilmiştir. Deney sırasında, maksimum kontrast dalga boyunda yüzde geçirgenlik ($\Delta T\%$) bir UV-vis spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. P(HKCN) için bu değerler -0.5V +1.0 V arasında 5 saniyede bir potansiyel verildiğinde maksimum kontrast ve tepki zamanı 800 nm için %36 ve 2.5 s ve 445 nm için %18 ve 3s olarak ölçülmüştür.(Şekil45)



Şekil 70. Potansiyel-zaman (a), 800 nm için geçirgenlik-zaman (b), 445 nm için geçirgenlik -zaman (c), akım-zaman (d) profilleri



3.6.7 Besleme oranına karşı kopolimer kompozisyonu

Bir polimerin kimyasal yapısı sadece makromolekölü oluşturan iki monomere değil, aynı zamanda bu tür birimlerin makromolekül zinciri boyunca nasıl dağıldığına bağlıdır. Bu dağılım her bir molekülün kopolimer oluştururken çözelti içindeki reaktivitesinin doğrudan sonucudur. Kopolimer kompozisyonunun bilinmesi maddenin hangi amaçla kullanılması için değerlendirilmesinde önemli bir adımdır. Kopolimerizasyonda en yaygın matematiksel model kopolimer kompozisyonu ve monomer reaktiflik oranını tespit edebilecek parametrelerin olduğu monomer besleme kompozisyonunu arasındaki ilişkiyi bulmaya dayanır. Kopolimer kompozisyonunun ve karalılığının monomer reaktivite oranıyla doğru rahmin edilmesi, kopolimerlerin gerekli fiziksel kimyasal özellikleri ile belirli uygulamalarının değerlendirilmesi için oldukça önemlidir.

Çözünmezlikleri nedeniyle iletken kopolimer kompozisyonlarının saptanması oldukça zordur. Bu çalışmada iletken kopolimerlerin kopolimer kompozisyonunun saptanması için kolay ve etkili bir metot önerilmiştir. Ancak tabiki bu yöntem şimdilik daha fazla ispata ihtiyaç duymaktadır. Bilindiği gibi kopolimerlerin optik özellikleri kopolimer kompozisyona bağlıdır. Kopolimerlerin optik özelliklerinin lineer olarak değiştiği düşünülürse, kopolimer kompozisyonu kolayca hesaplanabilir. Bu amaçla elektropolimerizasyonla elde edilen her bir kopolimerin $\pi-\pi^*$ geçişleri ve λ_{\max} değerleri karşılaştırılarak kopolimer kompozisyonları tahmin edilmiştir.

Farklı besleme oranlarına sahip monomer karışımlarını içeren çözeltilerin elektrokimyasal polimerleştirilmesi ile oluşan kopolimerlerin $\pi-\pi^*$ geçişleri ve maksimum dalga boyları (λ_{\max}) ölçülmüştür. Bu çözeltiler için spektroeletrokimyasal ölçümler şekil 7 de verilmiştir. Elde edilen kopolimerler ve ilgili homopolimerlerin λ_{\max} değerleri karşılaştırılarak kopolimer kompozisyonları kabaca hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 2 içinde özetlenmektedir.

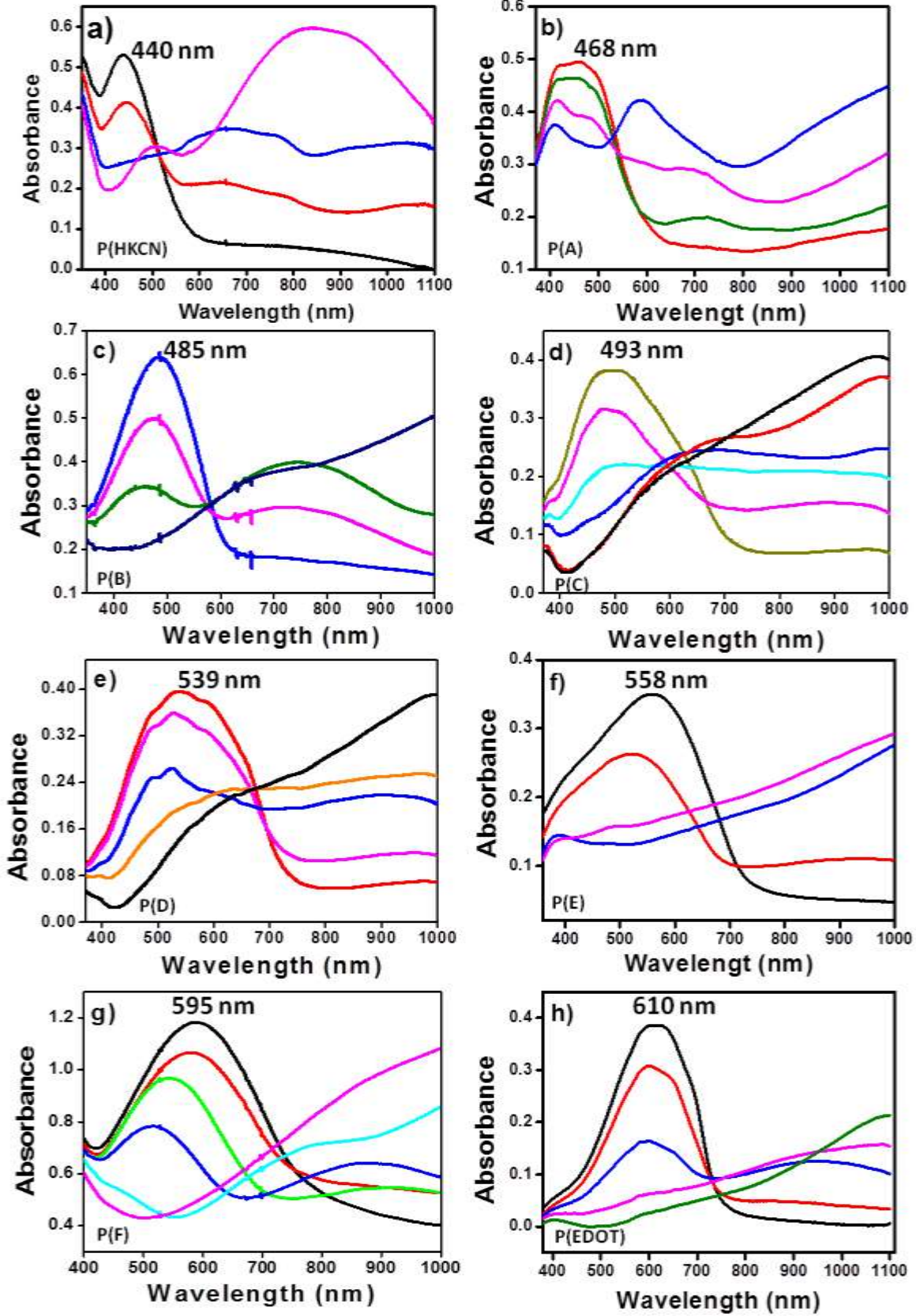
HKCN (monomer 1) ve EDOT (monomer 2) kopolimerizasyonu için kopolimer bileşimi F_1 e karşı monomer besleme oranı f_1 değerleri kullanılarak çizilen grafik Şekil 8 de gösterilmiştir.

Grafiktende görülebildiği gibi HKCN için radikalın kendi monomerini ekleme hız sabiti ile radikali diğer monomeri ekleme hız sabitlerinin oranı olan reaktif oranı r_1 birden büyük bir değere sahip olduğu bulunmuştur.

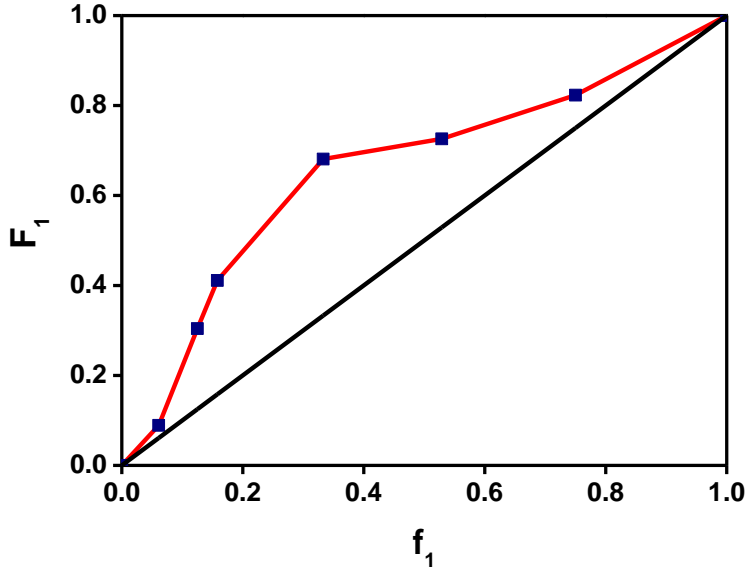


Tablo 6. Farklı besleme oranı içeren monomer çözeltilerinin elektrokimyasal polimerleştirilmesi ile oluşan kopolimerlerin özellikleri

Solution	f1	F1	λ_{\max}	E_g
HKCN	1	1	445	1.97
A	0.75	0.823	468	1.95
B	0.529	0.726	485	1.93
C	0.333	0.681	493	1.70
D	0.158	0.411	539	1.65
E	0.125	0.304	558	1.63
F	0.061	0.089	595	1.60
EDOT	0	0	610	1.57



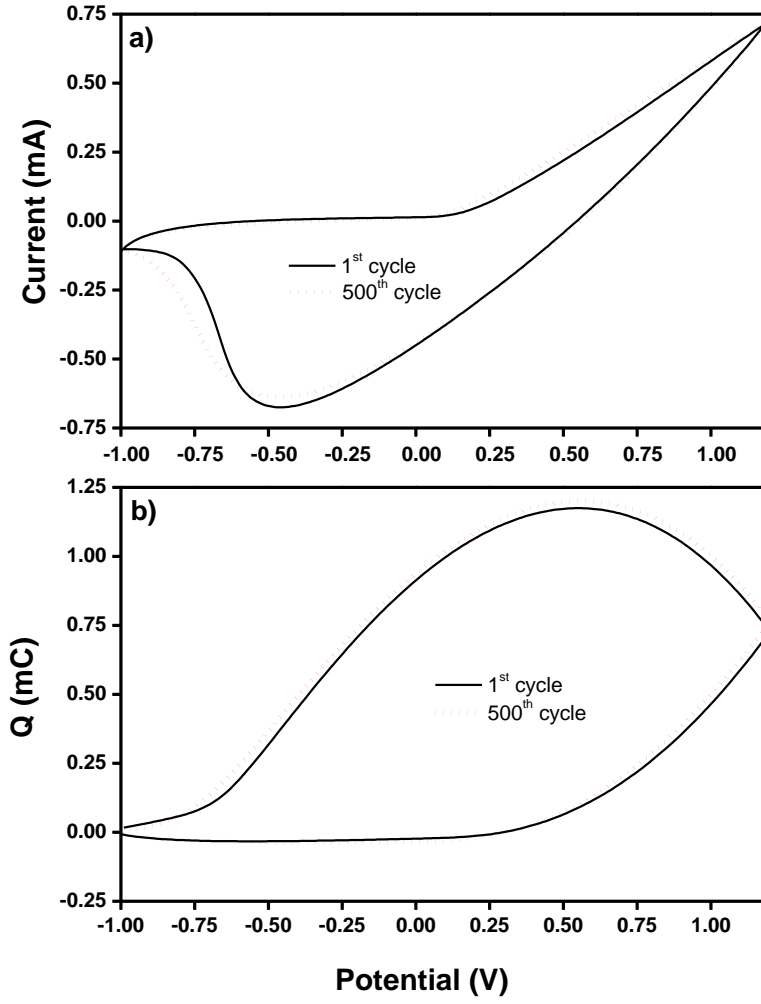
Şekil 71. . Polimer ve kopolimerlerin spektroeletrokimya grafikleri: a)P(HKCN) b) P(A) c) P(B) d)P(C) e)P(D) f) P(E) g) P(F) h) P(EDOT)



Şekil 72. HKCN kopolimerleri için monomer besleme oranına (f_1) karşı kopolimer kompozisyonları (F_1) grafiği.

3.6.8 P(HKCN)' nin Redoks Stabilitesi

Birden çok redoks çevrim sırasındaki elektroaktif polimerlerin zamanla redoks stabilitesinin yitirmesi elektrokromik cihaz uygulamalarındaki elektrokromik malzemelerin kullanımını kısıtlayıcı faktörlerdendir. Elektrokromik malzemelerin redoks stabilitesinin düşüklüğünün başlıca nedenleri yüksek gerilimler ve çevresel koşullardır. Dönüşümlü voltametri iletken polimerlerden uzun vadeli stabilitesinin ölçümünde kullanılabilir. Polimerin kararlılığını test etmek için, -1.0 V ve 1.2 V arasında 500 mV / sn 'lik bir tarama hızı ile defalarca potansiyel uygulanarak ilk ve 500. döngüler arasında akımda ve yük değerinde herhangi bir azalma gözlenmemiştir (Şekil 48a ve b). Bu da P(HKCN)'nin mükemmel çevresel ve redoks stabilitesine sahip olduğunu göstermiştir.



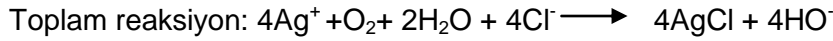
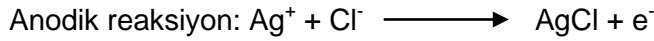
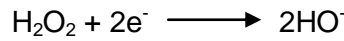
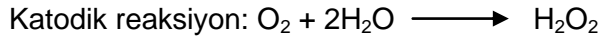
Şekil 73. P(HKCN)'nin 500mV/s tarama hızıyla art arda yapılan dönüşümlü voltametri grafikleri a) Akım-Potansiyel b) Yük-Potansiyel grafikleri



3.6.9 HKCN'nin Biyosensör Uygulamaları ve Yöntemler

3.6.9.1 Oksijen Tüketiminin Amperometrik Olarak İzlenmesi

İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark; ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrod yüzeyinde tüketilmesidir. Oksijen tüketimine ilişkin reaksiyonlar aşağıda verilmiştir.



3.6.9.2 HKCN/G. oxydans Biyosensörlerinin Hazırlanması

Mikrobiyal biyosensörler günlük inokulasyonlar sonucu elde edilen canlı hücrelerin HKCN vasıtasıyla grafit elektrodu yüzeyine immobilizasyonu ile hazırlandı. Log fazın sonundaki hücrelerin optik yoğunlukları spektrofotometrik olarak ölçüldü. *G. oxydans* hücrelerinin optik yoğunlukları 600 nm'de izlendi. Hazırlanan her mikrobiyal biyosensörün aynı sayıda hücre içermesi biyosensörlerin performans faktörleri açısından önemlidir. Bu nedenle elde edilen optik yoğunluk sonuçlarına bağlı olarak gerekli seyreltmeler yapılarak biyosensörler hazırlandı. Biyosensörlerin hazırlanışı sırasında ilk olarak hücreleri içeren 10 ml büyüme ortamı 4000 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst faz atıldı, çöken hücreler %0,1'lik NaCl çözeltisi ile yıkandı (4000g'de 5 dakika). Üst faz atıldı uygun hacimde pH: 7,0; 50 mM fosfat tamponunda çözüldü ve bu karışım biyosensör hazırlanmasında kullanıldı.

Mikrobiyal biyosensörün hazırlanma aşamaları:

1. Grafit (FIA için camımsı karbon elektrot) elektrot yüzeyi temizlendi. Daha sonra 0,1 M TBAPF₆, 1mg/ml HKCN dikolorometan çözeltisi içinde hazırlandıktan sonra döngüsel voltammetrik yöntemle 1,0 ile -1,0 V arasında 0,1 V/s tarama hızında 10 döngü ile elektropolimerizasyon işlemi uygulanarak elektrot yüzeyi monomer ile modifiye edildi.



2. 5 µl hücre ve 5 µl glutaraldehid çözeltisi (% 1'lik) elektrot yüzeyine damlatıldı ve yüzeyi kuruması için 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
3. Elektrot yüzeyi distile su ile yıkanarak çalışma sıcaklığı ve tamponunda 10 dakika bekletildi.

3.6.9.3 HKCN/G. oxydans Biyosensörleri ile Ölçüm İlkesi

Biyosensör hazırlandıktan sonra 10 dakika çalışma tamponunda bekletildi, daha sonra tampon değiştirilip çözünmüş oksijen miktarının sabitlenmesi için bekledi. Çözünmüş oksijen miktarı sabitlendikten sonra substrat (glukoz) ilave edildi. Substrat konsantrasyonu farklandıkça buna bağlı olarak değişen çözünmüş oksijen miktarı -0,7 V da izlendi. Buna bağlı olarak da ΔI değerleri μA olarak kaydedildi. Reaksiyon ortamındaki substratın miktarına bağlı olarak farklanan ΔI değerleri arasında kalibrasyon grafikleri oluşturuldu.

3.6.10 Kesikli (batch) sistem ile yapılan çalışmalar

3.6.10.1 Optimum pH'nın Belirlenmesi

Glukoz biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM konsantrasyonda sodyum fosfat ile pH'sı farklı tamponlar hazırlanarak en iyi biyosensör cevabının hangi pH değeri ile alındığı belirlendi.

3.6.10.2 Biriktirme Süresinin Optimizasyonu

Biyoaktif tabaka oluşturulmadan önce elektrot yüzeyinde monomerin elektrokimyasal polimerizasyon süreleri farklandırılarak biyosensörler hazırlandı. Bu amaç doğrultusunda 5, 10 ve 20 döngü ile yüzey modifiye edildi ve sabit hücre miktarı kullanılarak glukoz tayini için grafikler oluşturuldu.

3.6.10.3 Hücre Miktarının Optimizasyonu

Monomerin elektrokimyasal polimerizasyon süresinin optimizasyonundan sonra ikinci olarak hücre miktarının optimizasyonu yapıldı. Santrifüj sonrası elde edilen hücre pastası sırasıyla 55, 110, 220 µl 50 mM, pH 7,0 sodyum fosfat tamponunda çözüldü. HKCN ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyine 5 µl glutaraldehid çözeltisi ile birlikte 5 µl hücre pipetlenerek 3 farklı *G. oxydans* biyosensörü hazırlandı.



3.6.10.4 HKCN/*G. oxydans* Biyosensörlerinin Karakterizasyonu

Doğrusal Tayin Aralığı

Geliştirilen biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenleri, hücre miktarı ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrası karakterizasyonu amacıyla standart grafikler çizilerek glukoz ölçüm aralığı belirlendi.

3.6.11 FIA-HKC/N/G. *oxydans* Biyosensörüne ilişkin çalışmalar

3.6.11.1 Analitik karakterizasyon

Doğrusal Tayin Aralığı

Geliştirilen FIA sistem bağlantılı mikrobiyal biyosensörün karakterizasyonu amacıyla standart grafik çizilerek lineer ölçüm aralığı saptandı. Ölçümler sodyum fosfat tamponunda (50mM, pH:7), oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Yeniden Üretilebilirlik

Optimize edilmiş çalışma koşullarında hazırlanan HKCN/*G. oxydans* biyosensörü ile doğrusal tayin aralığına giren bir glukoz konsantrasyonu seçilerek tekrarlı 10 ölçüm alındı. Kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptanarak standart sapma (S.D) ve varyasyon katsayıları (c.v) hesaplandı.

Optimize edilmiş çalışma koşullarında hazırlanan HKCN/*G. oxydans* biyosensörü farklı günlerde hazırlandı ve farklı günlerde 1mM glukoz için alınan sensör cevapları karşılaştırıldı.

Operasyonel Stabilité

Hazırlanan HKCN/*G. oxydans* biyosensörünün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla daha önce optimizasyonu yapılan koşullarda FIA sisteminde akış durdurulmaksızın art arda ölçümler alındı. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek 3 saat boyunca yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.



3.6.11.2 Substrat Spesifikliği

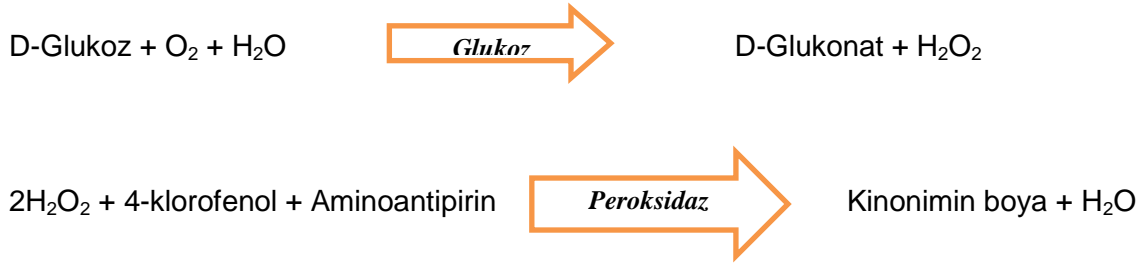
Hazırlanan mikrobiyal sensör ile diğer bazı bileşiklerin tayin edilemeyeceğinin anlaşılması için fruktoz, ksiloz, etanol ve gliserol kullanılarak ölçümler yapıldı. Ölçümler sodyum fosfat (50 mM; pH 7,0), oda sıcaklığında ve -700 mV'da gerçekleştirildi.

3.6.11.3 Farklı Bileşiklerin Biyosensör Cevabına Girişim Etkisinin Belirlenmesi

Glukoz yanında diğer bileşiklerin (askorbik asit, fenol, ürik asit) varlığının biyosensör cevabına etkisi incelendi.

Örnek Uygulama

Ticari olarak alınan gazlı içecekte, glukoz miktarını belirlemek amacıyla hem referans metod (Trinder reaksiyonu) hem de *G. oxydans* biyosensörleri kullanıldı.



Tablo 7. Referans metod prosedürü

	Kör (µl)	Standart (µl)	Örnek (µl)
Reaktif	1000	1000	1000
Distile Su	10	-	-
Standart	-	10	-
Örnek	-	-	10

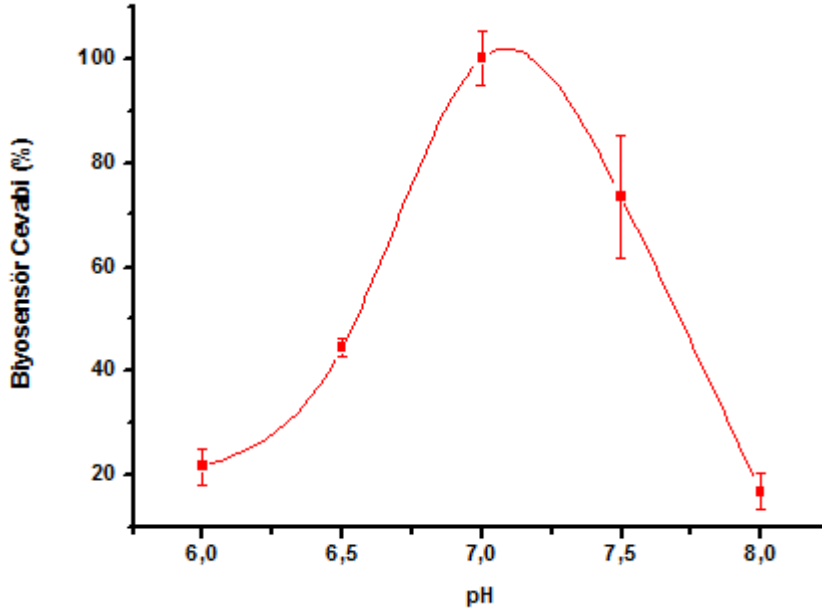
Karıştırdıktan sonra 10 dk. 37 °C de inkübe edilir. Köre karşı örnek ve standart absorbanları 510 nm de okunur.

3.6.12 Batch Uygulamalarda Elde Edilen Bulgular

3.6.12.1 *G. oxydans* Hücrelerini Temel Alan Biyosensörlerin Optimizasyonuna İlişkin Veriler

Optimum pH'nın Belirlenmesi

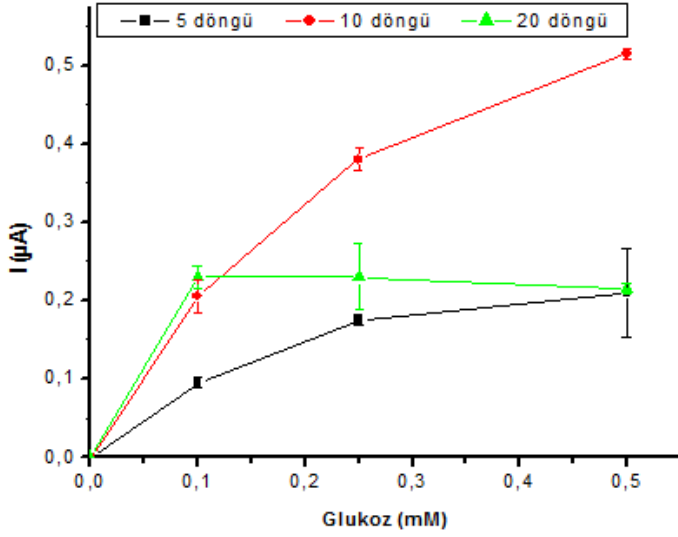
G. oxydans biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM konsantrasyonda sodyum fosfat ile pH'ları 6,0 ve 8,0 arasında farklı tamponlar hazırlandı. En iyi cevap pH 7; 50 mM fosfat tamponunda alındı.



Şekil 74. Biyosensör cevabı üzerine pH'nın etkisi (50mM; sodyum fosfat tamponu; oda sıcaklığı; -700mV hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

Biriktirme Süresinin Optimizasyonu

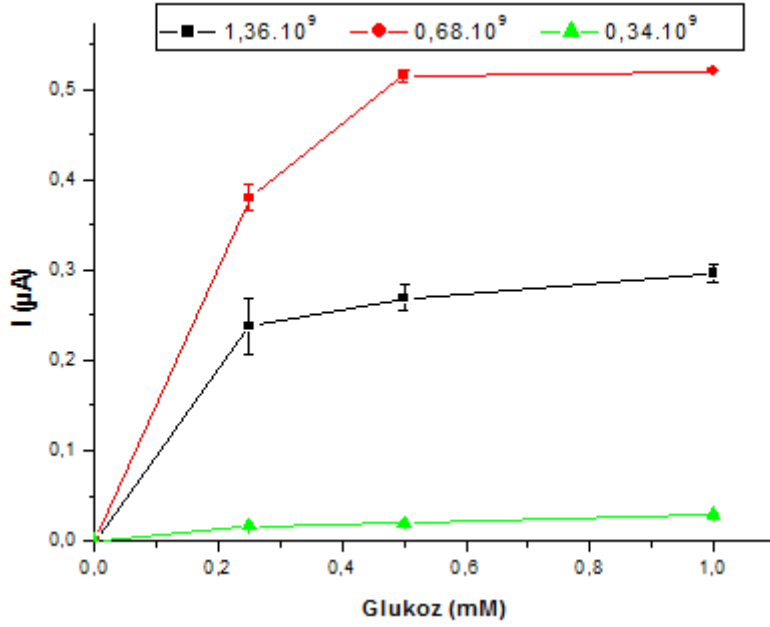
G. oxydans biyosensörlerinin optimizasyon çalışmalarında pH optimizasyonundan sonra iletken polimerin biriktirme süresinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada biriktirme süresinin biyosensör cevabı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Bu amaca yönelik olarak; biyosensör hazırlanmasında kullanılan döngü sayısı ile biyosensör cevabı arasındaki ilişki Şekil 50'de verilmiştir. Aynı hücre miktarlarıyla hazırlanmış biyosensörlerle glukoz standart grafikleri çizildi. En iyi biyosensör cevabı 10 döngü ile hazırlanan biyosensör ile alındı.



Şekil 75. Biyosensör cevabı üzerine biriktirme süresinin etkisi (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

Hücre Miktarının Optimizasyonu

HKCN ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyine; hücre pastası sırasıyla 55µl ($1,36 \cdot 10^9$ hücre), 110 µl ($0,68 \cdot 10^9$ hücre) ve 220 µl ($0,34 \cdot 10^9$ hücre) fosfat tamponunda çözülmüş ve her birinden 5µl alınarak 5µl glutaraldehyd çözeltisi ile birlikte pipetlenerek üç farklı *G. oxydans* biyosensörü hazırlanmıştır ve glukoz tayini amacıyla kullanılmışlardır. Şekil 51'de farklı hücre miktarları ile çizilen grafikten görüleceği üzere en yüksek akım değerlerinin 110µl tamponda çözülmüş hücre kullanılarak hazırlanan *G. oxydans* biyosensörleri ile elde edilmiştir.

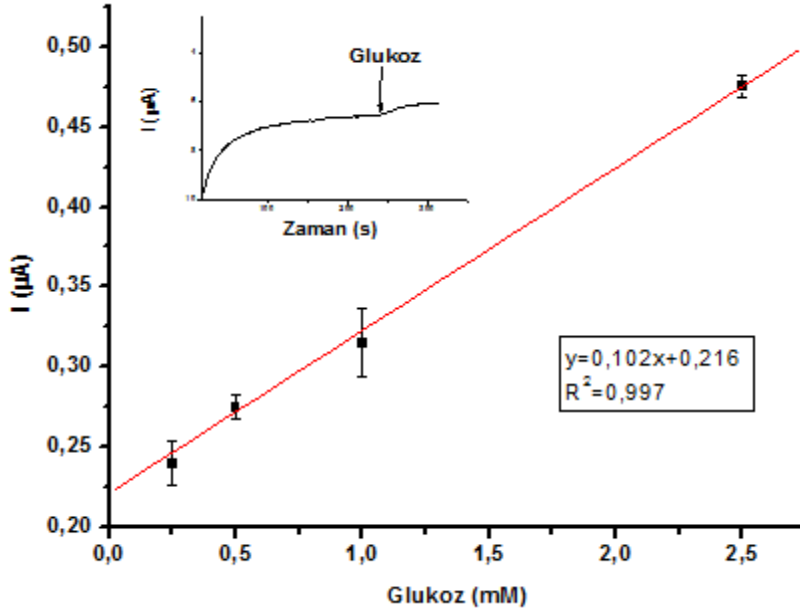


Şekil 76. Biyosensör cevabı üzerine hücre miktarının etkisi (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

3.6.13 HKCN/G.oxydans Biyosensörlerinin Karakterizasyonu

Doğrusal Tayin Aralığı

HKCN/G.oxydans biyosensörünün farklı substrat konsantrasyonlarında biyosensör cevabını incelemek amacıyla glukozun farklı konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları Şekil 52'de verilmiştir. 0,25-2.50 mM glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusallık gözlenmiştir.

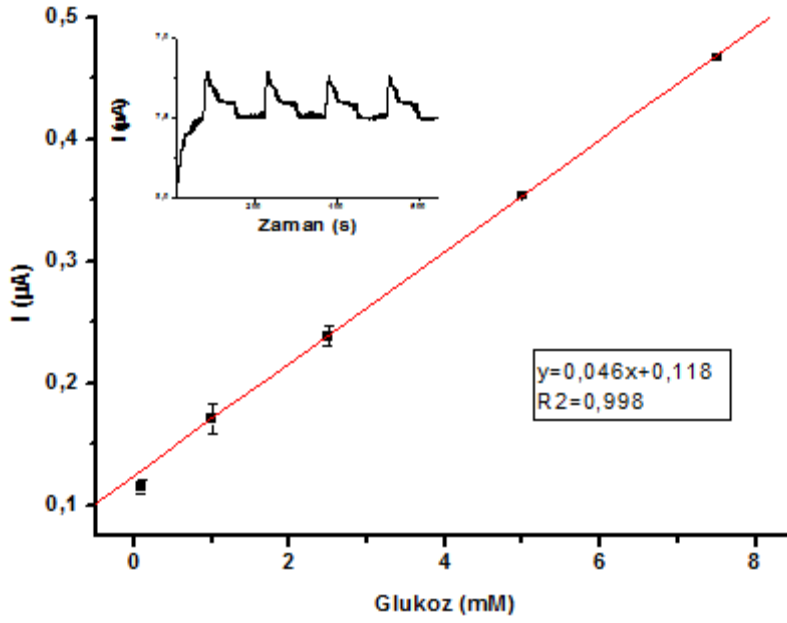


Şekil 77. . HKCN/G.oxydans biyosensörü ile glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

3.6.14 FIA Uygulamaları

3.6.14.1 Doğrusal Tayin Aralığı

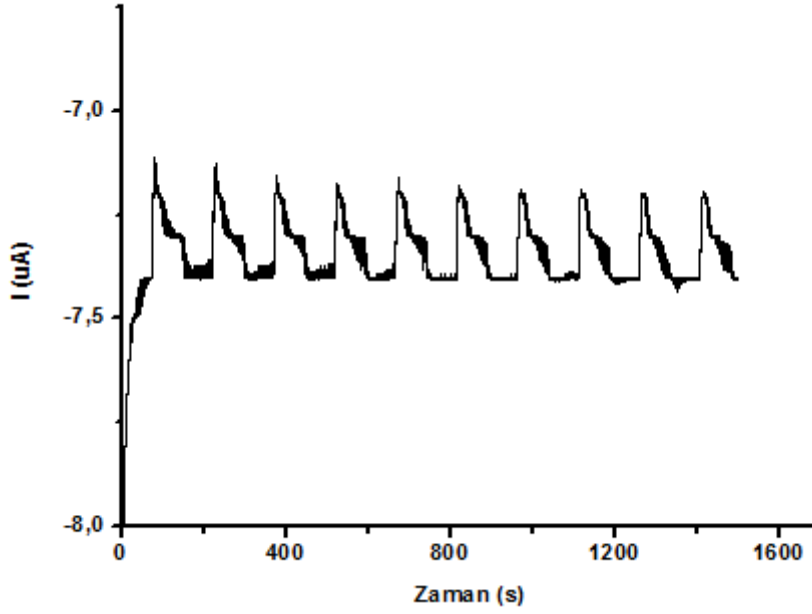
Belirlenen çalışma koşullarında, HKCN/G. *oxydans* biyosensörleri kullanılarak glukoz tayini gerçekleştirilmiştir. Glukoz konsantrasyonu ve akım arasındaki ilişkiden yararlanarak oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 53'de verilmiştir. 0,1-7,5 mM glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusallık gözlenmiştir.



Şekil 78.HKCN/*G. oxydans* biyosensörü ile glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

3.6.14.2 Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Yeniden Üretilebilirlik

Hazırlanan HKCN/*G. oxydans* biyosensörünün belirli glukoz konsantrasyonlarında çalışma tamponu ve çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirliği incelendi. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı. Bu işlemler sonrasında *G. oxydans* biyosensörü ile glukoz için standart sapma (S.D) : $\pm 0,035$ mM (n=10) ve varyasyon katsayısı (c.v) : % 1,87 olarak bulundu.

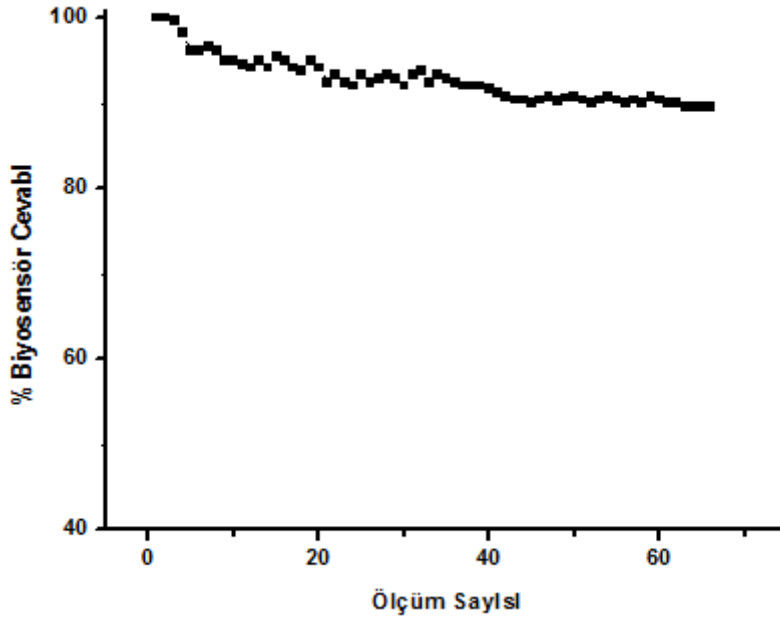


Şekil 79. HKCN/G. oxydans biyosensörü için tekrarlanabilirlik denemesinde elde edilen sinyaller. (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV; 2,5mM glukoz)

Yeniden üretilebilirlik için ise üç ayrı günde hazırlanan elektrotlarda 1 mM glukoz ile ölçümler alındı. Ölçümler kalibrasyon grafiğinde yerine kondu ve konsantrasyon değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlarda (S.D) $1,11 \pm 0,051962$ mM (n=3) ve varyasyon katsayısı (c.v) % 4,6 olarak bulundu.

3.6.14.3 Operasyonel Stabilité

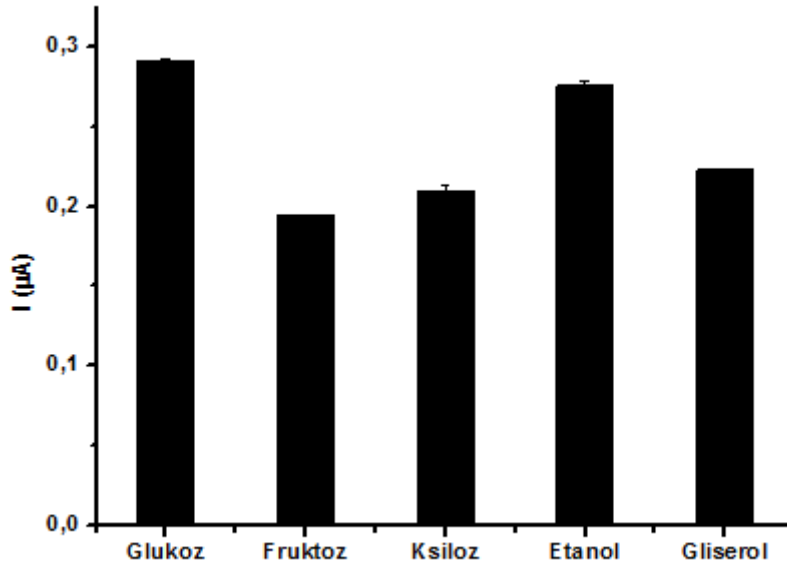
Hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerin operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla daha önce optimizasyonu yapılan koşullarda art arda ölçümler alınmıştır. Bu çalışma sonunda HKCN/G.oxydans için 3 saat (66 ölçüm) sonunda % 11 aktivite kaybı gözlenmiştir.



Şekil 80. Biyosensör cevabında zamanla meydana gelen değişim grafiği. (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV)

3.6.14.4 Substrat Spesifikliği

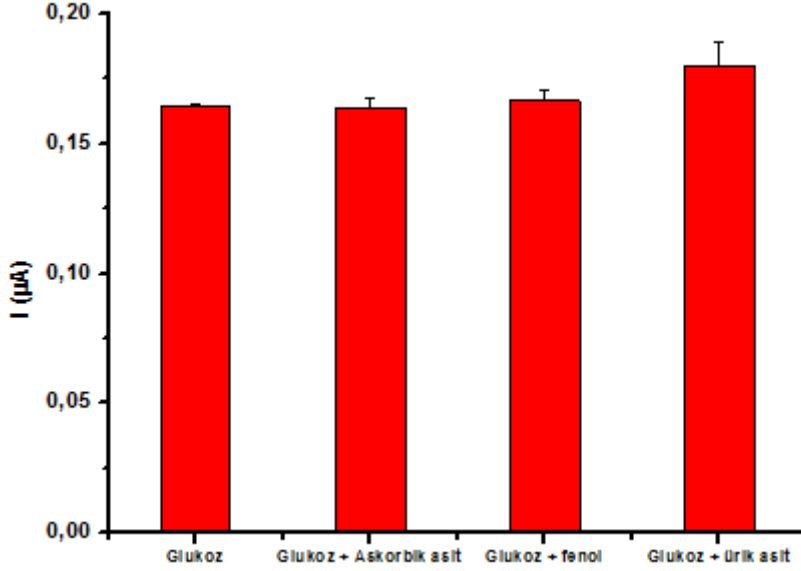
Farklı substratlar kullanılarak biyosensör sisteminin cevapları ölçüldü. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substratlar (fruktoz, ksiloz, etanol, gliserol) kullanılarak elde edilen biyosensör cevapları Şekil 56'da verilmiştir. Ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 81. Farklı substratlara ilişkin alınan biyosensör cevabı. (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

3.6.14.5 Farklı Bileşiklerin Biyosensör Cevabına Girişim Etkisinin Belirlenmesi

Glukoz yanında diğer bileşiklerin (askorbik asit, fenol, ürik asit) varlığının biyosensör cevabına etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 82. Diğer bileşiklerin varlığında biyosensörün glukozu verdiği cevap. (Sodyum fosfat tamponu; pH 7; 50 mM; oda sıcaklığı; -700mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

Akım değerlerine bakıldığında ürik asit haricinde diğer bileşiklerin glukoz ile birlikte ortama eklenmesi biyosensör cevaplarında herhangi bir girişime yol açmamıştır.

3.6.14.6 Örnek Uygulama

Ticari olarak temin edilen ve aynı glukoz içeriğine sahip olacak şekilde seyrelmeleri hazırlanmış gazlı içecek örneğinde mikrobiyal biyosensör kullanılarak glukoz tayini yapıldı. Ölçümler 3'er kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlara ilişkin değerler Tablo 7'de verilmiştir.

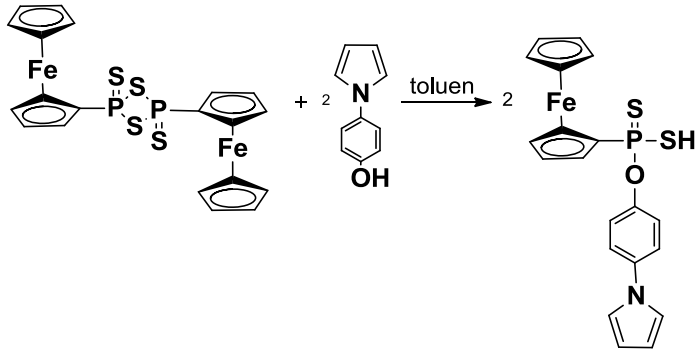
Tablo 8. Örnek uygulama sonucu

Örnek	Biyosensör cevabı	Referans metod	% Geri kazanım
Gazlı içecek	1,02mM ± 0,03	1,05mM ± 0,07	97,1

3.7 [FcP(=S)(μ -S)]₂ ile 4-(1-H-Pirol-1-yl) fenol reaksiyonu (TP-Fc)

3.7.1 TP-Fc'in sentezi

TP-Fc, [FcP(=S)(μ -S)]₂ ile 4-(1-H-Pirol-1-yl)fenol'un toluen içindeki reaksiyonu ile sentezlenmiştir (Şekil 1). Detaylı sentez bilgileri şu şekildedir. 0,25 g (0,446 mmol) [FcP(=S)(μ -S)]₂, 10 ml toluen içerisinde 0,142 g (0.892 mmol) 4-(1-H-Pirol-1-yl) fenol ile (1:2 mol oranında) reaksiyona sokulmuş böylece TP-Fc bileşiği elde edilmiştir. Reaksiyon karışımı tüm katı bileşenler çözülüp sarımsı bir çözelti elde edilinceye kadar ısıtılmıştır. Sarı-turuncu renkli kristal süzülüş ve kurutulup, 0.40 g ürün elde edilmiştir (Şekil 69).

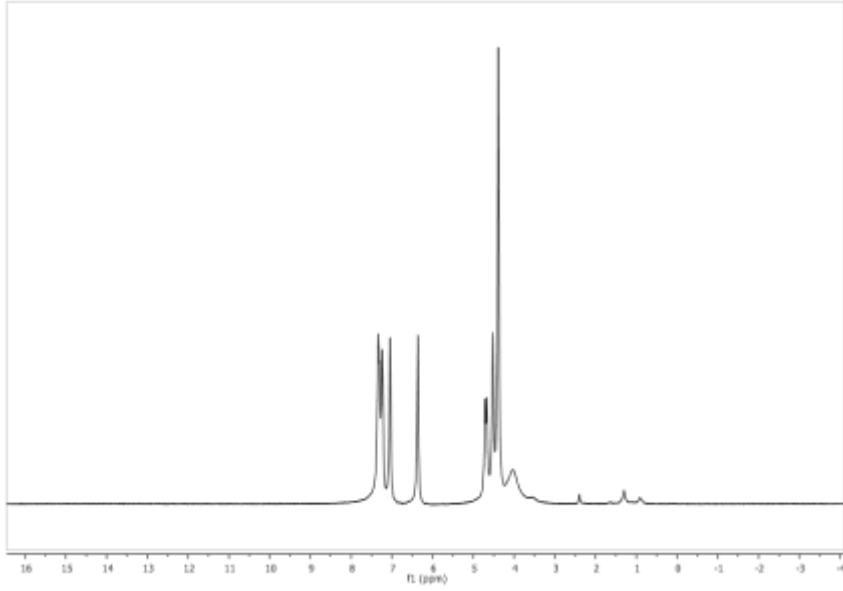


Şekil 83. TP-Fc sentez şeması

3.7.2 TP-Fc Monomerine Ait ¹H-NMR ve FTIR Spektrumu

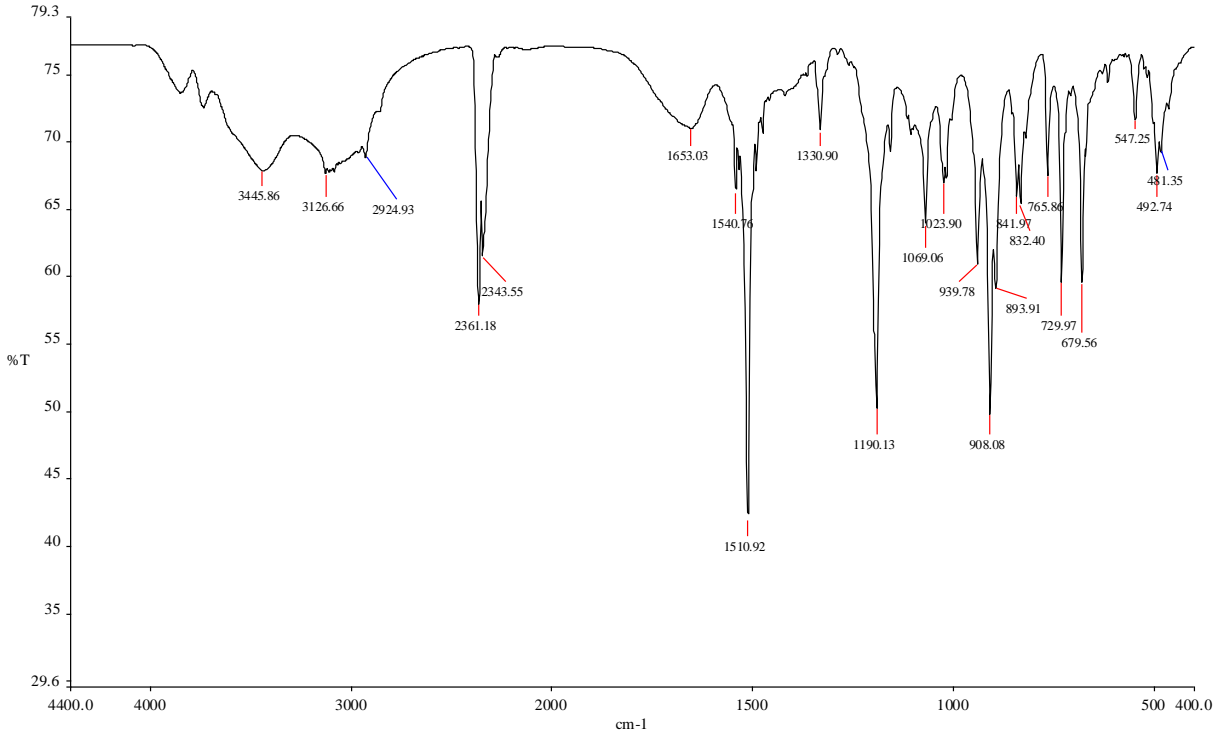
Sentezlenen açık sarı renkli monomerin yapısal karakterizasyonları ¹H-NMR, spektrumu ile karakterize edilmiştir.

Şekil 70'te verilen ¹H-NMR spektrumu için CH₂Cl₂ solvent olarak kullanılmış ve tetrametilsilan referansına göre kimyasal kayma (δ) değerleri verilmiştir.



Şekil 84. TP-Fc maddesinin ¹H -NMR Spektrumu

Sentezlenen monomerin kimyasal olarak incelenebilmesi için FTIR analizi de yapılmıştır. Şekil 71’de FTIR analizine ait pik değerleri verilmiştir.



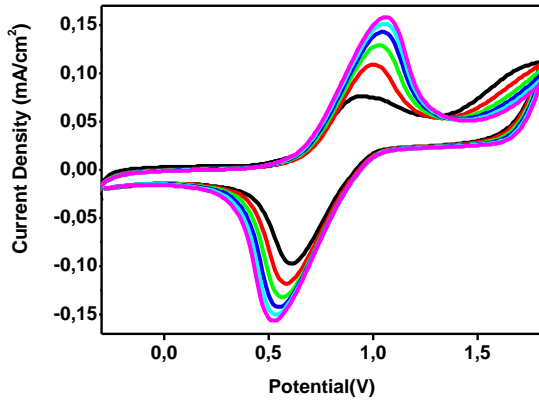
Şekil 85. TB-Fc maddesinin FTIR Spektrumu

3.7.3 TP-Fc' nin Farklı Çözücülerdeki Redoks özellikleri ve Polimerleştirilmesi

TP-Fc'in polimerleştirilmesinde birçok çözücü ve destek elektrolit çifti denenmiş ve her biri ile elektrokimyasal çalışmalar yapılmıştır.

3.7.3.1 TP-Fc' nin Diklorometan (DCM) içerisindeki Redoks özellikleri ve Polimerleştirilmesi

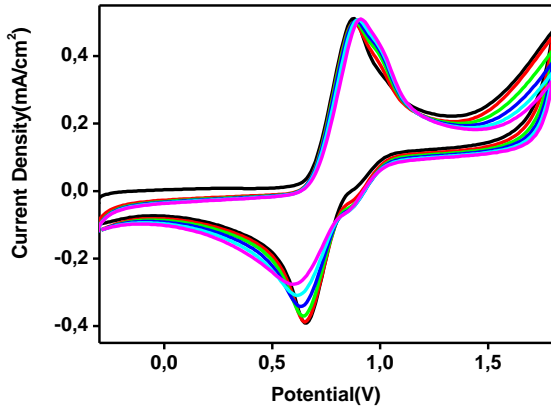
Polimerleşme, Diklorometan (DCM) içerisinde ve Tetrabutylamonyum hekzaflorofosfat (TBFF₆) destek elektrolit kullanılarak gerçekleştirilebilmiştir. TP-Fc bileşiğinin -0,3:+1,8V potansiyel aralığında, 250 mV/s tarama hızında alınmış döngülü voltamogramı Şekil 70'de verilmiştir. İlk döngüde ferrosenin oksidasyonuna ait olan ve 0,95 V' ta gözlenen pik ikinci döngüde 1.05 V'a kaymıştır. İndirgenme piki 0.60 V'ta gözlenmiştir. Dönüşümlü voltametri grafiklerinin şekil ve potansiyel değerleri farklılığından TP-Fc monomerinin P(TP-Fc) polimeri oluşturmak üzere kopolimerleştiğini göstermektedir. Kopolimerleşme; spektroeletrokimyasal deneyler ile doğrulanmıştır.



Şekil 86. TP-Fc'ye ait DCM/TBFF6 içinde 250 mV/s tarama hızında alınmış Döngüsel Voltamogram

3.7.3.2 TP-Fc'nin Asetonitril (ACN) içerisindeki Redoks özellikleri ve Polimerleştirilmesi

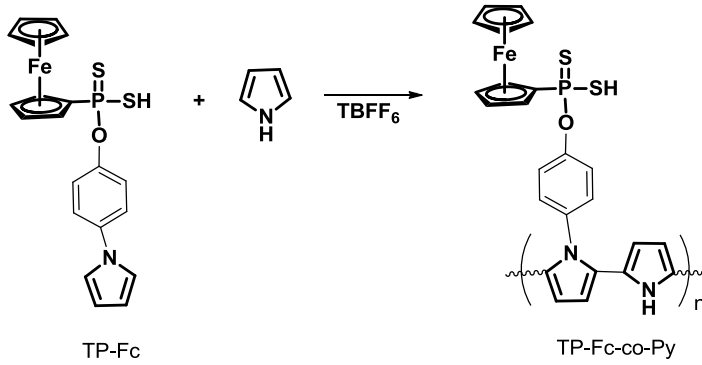
Bu çalışmada polimerleşme Asetonitril (ACN) içerisinde ve TBFF₆ destek elektrolit kullanılarak gerçekleştirilebilmiştir. TP-Fc bileşiğinin -0,3:+1,8V potansiyel aralığında, 250 mV/s tarama hızında alınmış döngülü voltamogramı Şekil 73'te verilmiştir. İlk döngüde ferrosenin oksidasyonuna ait olan ve 0,87 V' ta gözlenen pik ikinci döngüde 0,90 V'a kaymıştır. İndirgenme piki 0.64 V'ta gözlenmiştir.



Şekil 87. TP-Fc'ye ait ACN/TBFF6 içinde 250 mV/s tarama hızında alınmış Döngüsel Voltamogram

3.7.4 TP-Fc' nin Farklı Çözücülerdeki Redoks özellikleri ve Pirel İle Kopolimerleştirme Çalışmaları

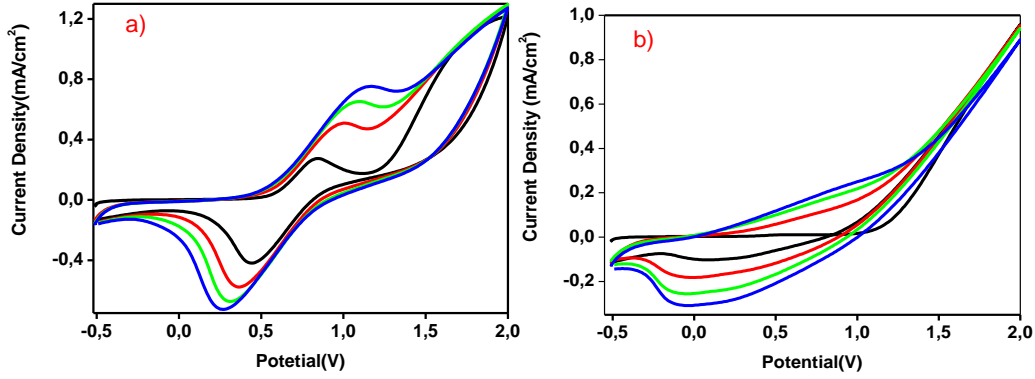
Bu çalışmada, sentezlenen TP-Fc ile Pirelün (Py) farklı çözücüler (DCM, ACN) içinde TBFF₆ destek elektroliti kullanılarak kopolimerleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. (Şekil 74)



Şekil 88. TP-Fc-co-Py kopolimerleştirme şeması

3.7.4.1 TP-Fc' nin Diklorometan (DCM) içerisinde Pirel(Py) ile Kopolimerleştirme çalışması

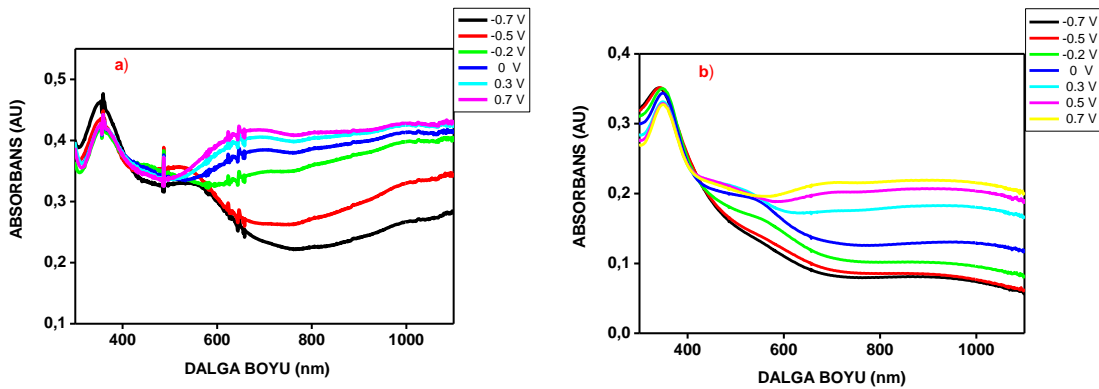
Kopolimerleştirme, DCM içerisinde ve TBFF₆ destek elektrolit ve Py kullanılarak gerçekleştirilebilmiştir. TP-Fc bileşiğinin -0,5:+2,0V potansiyel aralığında, 250 mV/s tarama hızında alınmış döngülü voltamogramı Şekil 73.a' da verilmiştir. Şekil 73.b' de karşılaştırma amaçlı aynı koşullarda çekilmiş Py CV' si verilmiştir. Polipirel (P(Py)) ait oksidasyon piki geniş bir aralıkta gözlenmekte 0.1-1.15 V) ve indirgenme piki -0,11 V olarak belirlenmiştir.



Şekil 89. P(TPFc-co-Py) (a) ve P(Py) (b) bileşiklerine ait TBFF6 içinde 250 mV/s tarama hızında alınmış Döngüsel Voltamogramlar

3.7.4.2 TPFc/Py Kopolimerinin (P(TPFc-co-Py)) DCM içerisindeki spektroeletrokimyasal özellikleri

Spektroeletrokimya deneyleri için TP-Fc/Pirol sabit 1,8 V potansiyel altında ITO elektrot üzerinde film halinde kaplanarak sentezlenmiştir. Spektroeletrokimya deneyleri Py monomeri içeren, TBFF₆ çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. P(TPFc-co-Py)'nin ve P(Py) spektroeletrokimya grafikleri Şekil 74'de verilmiştir.

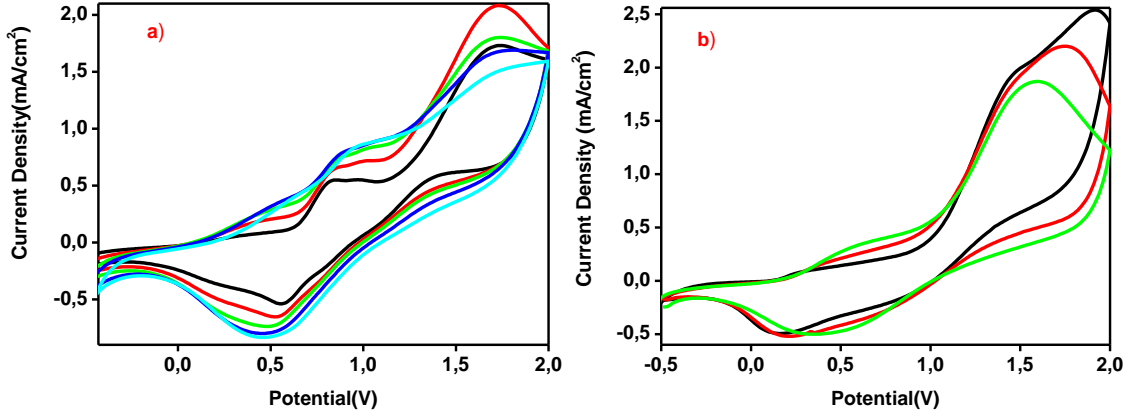


Şekil 90. P(TPFc-co-Py) (a) ve P(Py) (b) ait spektroeletrokimya grafikleri

3.7.4.3 TP-Fc' nin Asetonitril (ACN) içerisinde Pirol (Py) ile Kopolimerleştirme çalışması

ACN içerisinde ve TBFF₆ destek elektrolit ve Py kullanılarak kopolimerleştirme gerçekleştirilebilmiştir. TP-Fc bileşiğinin -0,5:+2,0V potansiyel aralığında, 250 mV/s tarama hızında alınmış döngülü voltamogramı Şekil 77.a' da verilmiştir. İlk döngüde ferrosenin

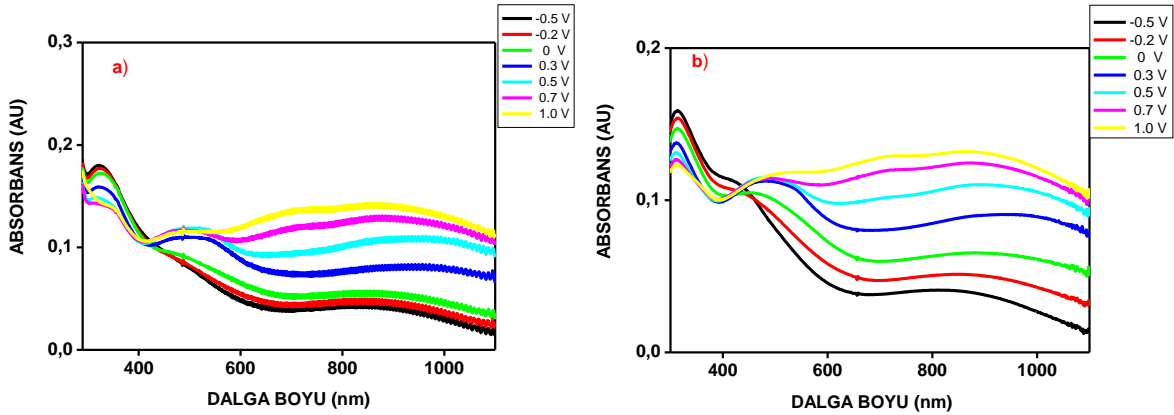
oksidasyonuna ait olan ve 0,83 V' ta gözlenen pik ikinci döngüde 0.93 V'a kaymıştır. İndirgenme piki 0.55 V'ta gözlenmiştir. Şekil 77.b'de karşılaştırma amaçlı aynı koşullarda çekilmiş pirolün CV' si verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi P(Py) ait oksidasyon piki 1,5 V ve indirgenme piki 0,36 V olarak belirlenmiştir.



Şekil 91. P(TPFc-co-Py) (a) ve P(Py) (b) bileşiklerine ait TBFF6 içinde 250 mV/s tarama hızında alınmış Döngüsel Voltamogramlar

3.7.4.4TP-Fc/Py Kopolimerinin ACN içerisindeki spektroeletrokimyasal özellikleri

TPFc/Py sabit 1,8 V potansiyel altında ITO elektrot üzerinde film halinde kaplanarak sentezlenmiştir. Spektroeletrokimya deneyleri Py monomeri içeren, TBFF₆ çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. P(TPFc-co-Py) ve P(Py) ait spektroeletrokimya grafikleri Şekil 78'de verilmiştir.



Şekil 92. a. P(TPFc-co-Py) (a) ve P(Py) (b) ait spektroeletrokimya grafikleri



3.7.5 Biyosensör Uygulamaları

3.7.5.1 Enzim Elektrodu Hazırlanması

Bu çalışmada, enzim biyosensörlerinin ana bileşeni olarak Glukoz/GOx enzimini içeren medyatörlü enzim biyosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Biyosensör çalışmalarının şematik gösterimi Şekil 79'da özetlenmiştir.

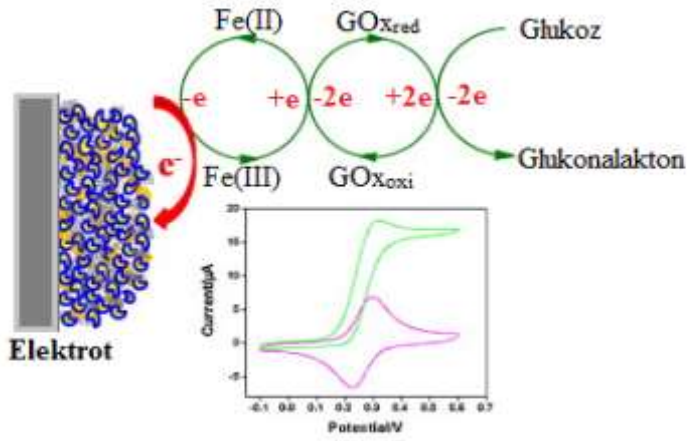
Bu amaçla, ilk olarak TP-Fc ve TPA monomerleri kopolimer yapılarak grafit elektrotlarının yüzeyi modifiye edilmiştir. Daha sonra GOx, çapraz bağlayıcı olan GA vasıtasıyla modifiye elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Hazırlanan TPFc-co-TPA/GOx enzim biyosensörlerinin performansını etkileyen önemli parametrelerin optimizasyonu sonrasında analitik karakterizasyonu yapılmıştır.

3.7.5.2 Elektrot Performans Çalışmaları

Enzim elektrodunun tasarımı sırasında kullanılan ve sonrasında da performansının incelendiği sistem, elektroliz hücresi ve elektrotları muhafaza eden hücre standından oluşmaktadır. Deneyler üçlü elektrot sistemi ile yürütülmüştür. Karbon elektrotların modifiye edilmesiyle oluşturulan enzim elektrodu sisteme çalışma elektrodu olarak bağlanmış; referans elektrodu olarak gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrot ve karşıt elektrot olarak da platin (Pt) elektrot kullanılmıştır.

3.7.5.3 Ferrosenin Redoks Özelliğinden Faydalanarak Amperometrik Olarak Sensör Cevabının İzlenmesi

Ferrosenin redoks özelliğinin amperometrik olarak izlenmesi şu şekilde gerçekleştirilmiştir. Biyosensör hazırlandıktan sonra 10 dakika boyunca çalışma tamponunda bekletilmiş, daha sonra tampon değiştirilip çözünmüş akım değerinin sabitlenmesi için beklenmiştir. Sabitlendikten sonra substrat (glukoz) ilave edilerek, substrat konsantrasyonu farklandıkça, buna bağlı olarak değişen akım değerleri amperometrik olarak -0,7 V da izlenmiştir ve ΔI değerleri μA olarak kaydedilmiştir. Reaksiyon ortamındaki substratın miktarına bağlı olarak farklı ΔI değerleri arasında kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.



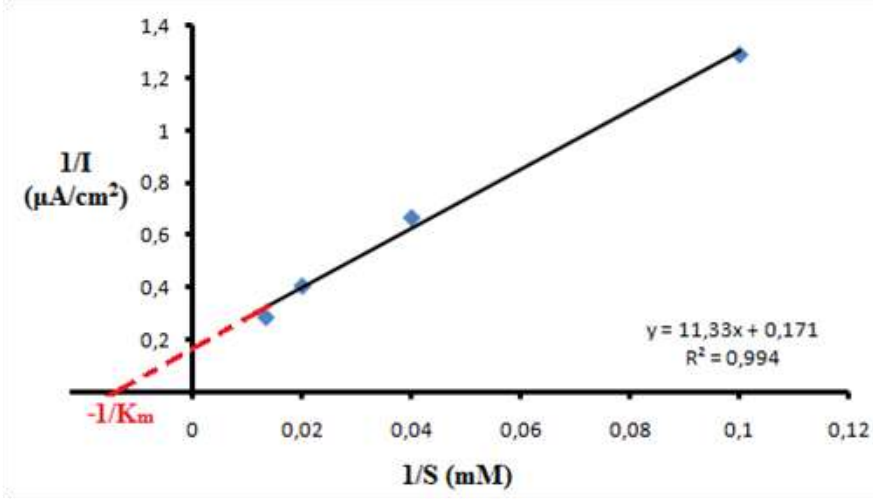
Şekil 93. Biyosensör çalışmalarının şematik gösterimi

3.7.5.4 Lineweaver-Burk Km, I_{max} Değerlerinin Hesaplanması

Lineweaver ve Burk, Michelis ve Menten'in eşitliğini düz bir doğru üzerinde işaretlemeye imkan tanıyan bir formda yazmışlardır. Bu forma göre;

$$\frac{1}{I} = \frac{K_m}{I_{\max} [S]} + \frac{1}{I_{\max}}$$

1/S'ye karşı 1/I grafiği çizildiğinde düz bir doğru elde edilmektedir. Bu doğrunun eğimi K_m/I_{\max} , y eksenindeki kesim noktası ise $1/I_{\max}$ 'i vermektedir.(Şekil 80)

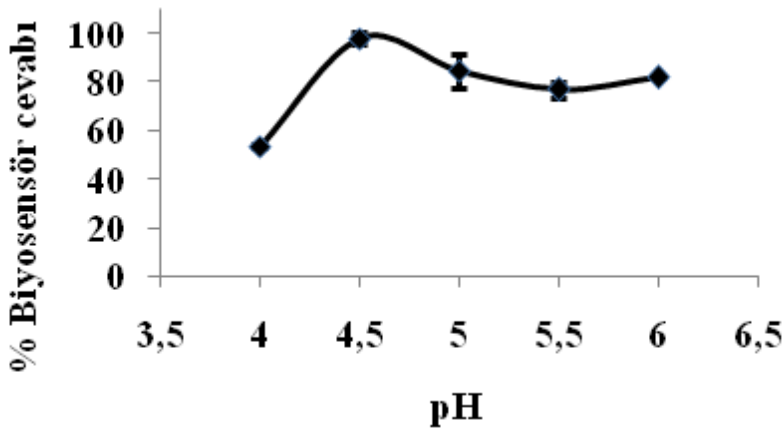


Şekil 94. TPFc-co-TPA/GOx enzim elektrodunun Lineweaver-Burk eğrisi

Buna göre deneysel verilerle çizilen grafik sonucu; K_m/I_{max} değeri 11.33, $1/I_{max}$ değeri 0.171 bulunmuş ve bu veriler kullanılarak $-1/K_m$ hesaplanmış ve 66.108 bulunmuştur.

3.7.5.5 pH Optimizasyonu

TPFc-co-TPA/GOx biyosensörü ile yapılan deneyler sonunda 0,450 V'da elde edilen amperometrik cevapların bağıl değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirilerek elde edilen pH grafiği Şekil 81' de verilmiştir.

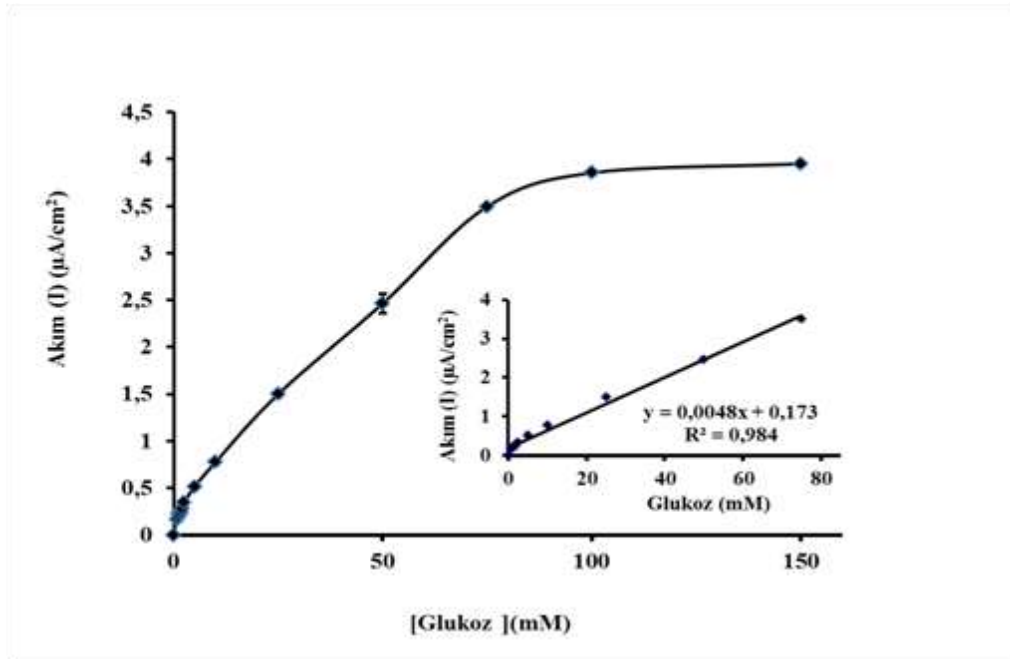


Şekil 95. TPFc-co-TPA/GOx biyosensörlerine pH'nın etkisi

Şekil 81 incelendiğinde maksimum cevap akımı pH 4.5'te gözlenmiştir. Enzim ve substrat moleküllerinde asidik ve bazik grupların iyonlaşma durumu, Enzim-Substrat (E-S) aktifleşmiş kompleksinin oluşum hızını belirlemektedir. E-S kompleks oluşumunun maksimum olduğu koşuldaki iyonlaşma durumunun sağlandığı pH değeri (4.5) çalışma pH değeri olarak seçilmiştir

3.7.5.6 Enzim Elektrodunun Kalibrasyonu

TPFc-co-TPA/GOx ile hazırlanan enzim elektrodu için, substrat konsantrasyonunun akım yoğunluğuna etkisi incelenerek, kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır. Bu amaçla hazırlanan enzim elektrotlarının amperometrik cevapları, kronoamperometri yönteminde 0.45 V'da ölçülerek grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 96. Elektrokimyasal immobilizasyon yöntemiyle hazırlanmış TPFc-co-TPA/GOx kalibrasyon eğrisi (Sodyum Asetat Tamponu, pH 4.5)

Şekil 82 incelendiğinde, akım yoğunluğunun 1-100 mM glukoz derişimi aralığında doğrusal olarak arttığı, 100 mM glukoz derişiminden sonra ise sabit kaldığı görülmüştür. 2.5-75 mM glukoz konsantrasyonu aralığının doğrusal bölge olduğu bulunmuştur. Doğrusal olduğu belirlenen bölgede, orta değer seçilerek (50 mM) analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği için bu değer kullanılmıştır.



3.7.5.7 Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği

Optimize edilmiş çalışma koşullarında hazırlanan TPFc-co-TPA/GOx biyosensörü için doğrusal tayin aralığına giren bir glukoz konsantrasyonu (50 mM) kullanılarak 12 ölçüm alınmıştır. Alınan değerlere bağlı çizilen kalibrasyon grafikleri yardımıyla standart sapma (S.S) $\pm 0,445$ mM (n=12) ve varyasyon katsayısı (cv) % 4,84 (n:12) olarak hesaplanmıştır. Tablo 1' de deneysel veriler ve bu verilerle hesaplanan standart sapma ve varyasyon katsayısı gösterilmiştir.

3.7.5.8 Örnek Uygulama

Hazırlanan TPFc-co-TPA/GOx biyosensörü kullanılarak iki farklı ticari örnekte glukoz analizi gerçekleştirilmiştir. GOx bazlı biyosensörler için, ticari örneklere ön hazırlama işlemi uygulanması gerekli olmadığından, örnek substrat olarak kullanılmak üzere direk olarak sodyum asetat tamponu içeren hücre içerisinde uygulanmıştır. (pH:4.5 50 mM) Tablo 8' de glukoz oksidaz biyosensörleri ve spektrofotometrik yöntem kullanılarak iki farklı ticari örnekte glukoz analizine ait veriler gösterilmektedir.

Tablo 9. TPFc-co-TPBA/GOx ve spektrofotometrik yöntem kullanılarak iki farklı örnekte glukoz analizi

Örnek	Glukoz (g/l)*		
	Spektrofotometrik metod	TB/TP/GOx	% Geri Kazanım
Fruko	5,141 \pm 0,122	5,433 \pm 1,017	95
Meyve Suyu	5,810 \pm 0,388	6,332 \pm 0,037	92

*Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

3.7.5.9 Girişimci Testi

Biyosensörlerin farklı örneklerde uygulanabilirliği kısıtlayan en önemli etmenlerden bir tanesi de girişim yapabilecek bileşiklerin ortamda varlığıdır. Alkollü içeceklerde glukoz tayini için etanol ve meyve sularında glukoz tayini için fenolikler potansiyel girişimci bileşikleridir. TP-Fc-co-TPBA/GOx biyosensörünün çeşitli örneklerdeki uygulanabilirliğini test etmeden önce etanol ve fenolik bir bileşiğin biyosensör cevabına etkisi test edilmiştir. (Tablo 9)



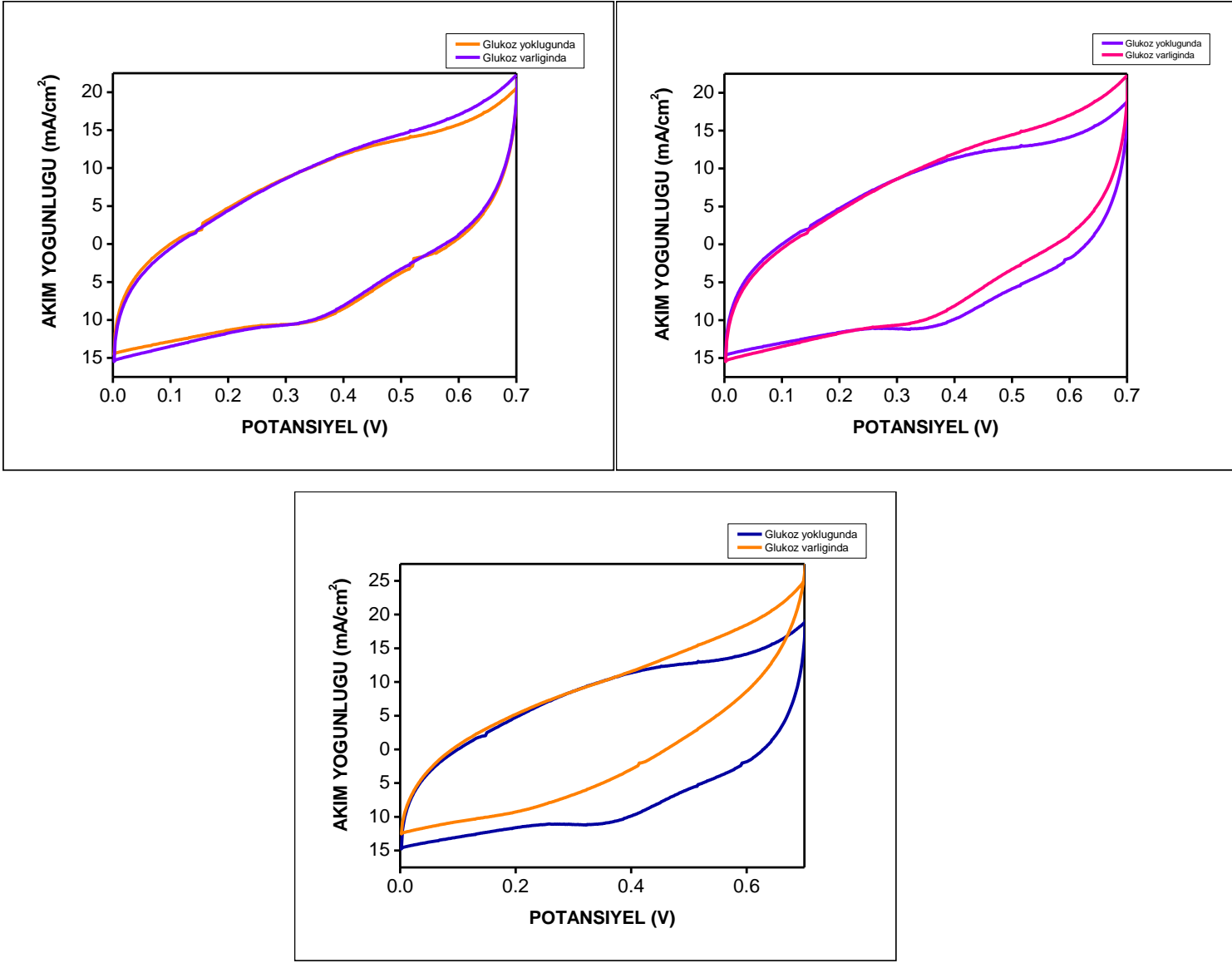
Tablo 10. Etanol ve 3-asetamido fenol bileşiklerinin TP-Fc-co-TPBA/GOx ait biyosensör cevabına etkisi

Bileşik	Biyosensör cevabı	% Girişim	
Glukoz	0,512±0,018	-	
3-AAF	-	-	
Glukoz+3-AAF	0,5515±0,015	107	
Etanol			
Glukoz+Etanol	0,6312±0,019	123	

[Glukoz]: 50 mM; [Etanol]: 50 mM;

3.7.5.10 Enzim Elektrodunun Dönüşümlü Voltametri İncelemesi

Yukarıdaki çalışmalarda pH optimizasyonu, enzim elektrodu için substrat konsantrasyonunun akım yoğunluğuna etkisi gibi parametrelerin elektrot performansı üzerindeki etkisi kronoamperometrik yöntemlerle incelenmiştir. Bu parametreler kullanılarak, 0.1 M TBAPF₆ ve DCM çözeltisi içerisinde ayrı ayrı TP-Fc, TPA ve TPFc-co-TPA içeren çözeltiler hazırlandıktan sonra döngüsel voltametik yöntemle -0.5 V ile 1.8 V arasında 0.25 V/s tarama hızında 5 döngü ile elektropolimerizasyon işlemi uygulanarak elektrot yüzeyleri modifiye edilmiştir ve sonrasında belirlenen potansiyel aralıklarında bu elektrotların tampon ortamında (pH 4.5 sodyum asetat tamponu) ve 50 mM glukoz varlığında (pH 4.5 sodyum asetat tamponu) elde edilen dönüşümlü voltametri incelemesi Şekil 81 de verilmiştir. Elde edilen voltammogramlardan görüldüğü üzere glukoz eklendikten sonraki akım değerlerindeki farklanma kopolimer ile görülmüştür. Tek başına TP-Fc ile hazırlanan elektrotta monomer serbest amino gruplarına sahip olmadığı için stabil bir enzim immobilizasyonu gerçekleştirilememiştir, tek başına TPA ile hazırlanan elektrotta ise biyosensör cevabını oluşturan ferrosenin bulunmadığından dolayı akımda farklanma gözlenmemektedir.



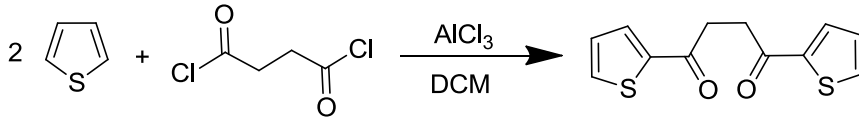
Şekil 97. Glukoz yokluğunda ve glukoz varlığında, sırasıyla, TP-Fc ; TPA ; ve TPFc-co-TPA elektrotlara ait, dönüşümlü voltagramlar

3.8 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin (RF) ve 3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin

3.8.1 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin (RF) ve 3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin Sentezi ve Elektrokimyasal Özellikleri

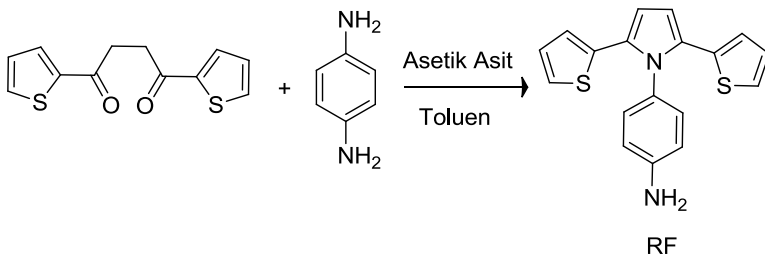
4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin Sentezi (RF)

100 ml'lik balona 16 ml DCM çözücüsü ve $AlCl_3$ (16g, 0,12 mol) eklenmiştir. Damlatma hunisine tiyofen(9.6 ml, 0,12 mol) , süksinil diklorür (5.6 ml, 0.5 mol) ve 10 ml DCM çözücüsü eklenip sıcaklık 20 dereceyi geçmeyecek şekilde 4 saat boyunca karıştırma işlemi uygulanmıştır. Karıştırmanın sonunda karışıma 7 ml HCl eklenmiştir ve karışım sırasıyla DCM, 2M HCl ve % 5 lik $NaHCO_3$ çözeltileriyle ekstrakte edilmiştir. Çözücüsü uçurulan madde etanolde kristallendirilmiştir ve % 53 verimle Şekil 3.1 de gösterilen 1,4-di(tiyofen-2-yl)bütan-1,4-dion başlangıç maddesi sentezlenmiştir. (E.N. 120 °C)



Şekil 98. 1,4-di(tiyofen-2-yl)bütan-1,4-dion sentezi

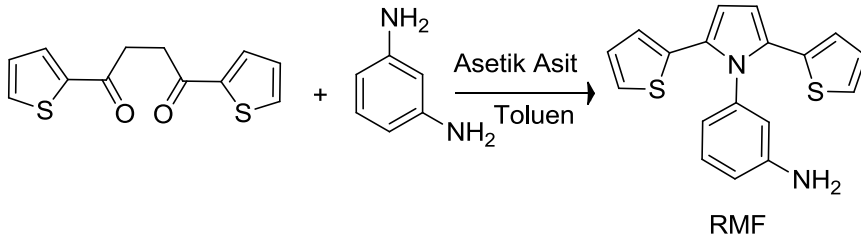
Daha sonra 100 ml'lik bir balona 1,4-bis(2-tiyenil)bütan-1,4-dion (1g, 0,004 mol) , p-fenilen diamin (0.648 g, 0,006 mol), glasiyel asetik asit (5 ml) ve 50 ml toluen eklenmiştir. Karışım Dean-Stark tuzağıyla birlikte 4 gün boyunca reflaks edilmiş ve oluşan maddeye flash kromatografisi uygulanmıştır. % 76 verimle 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin (RF) monomeri sentezlenmiştir[35]. Şekil 85'de RF maddesinin sentez şeması gösterilmiştir. (E.N.180 °C)



Şekil 99.4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin sentezi

3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin Sentezi (RMF)

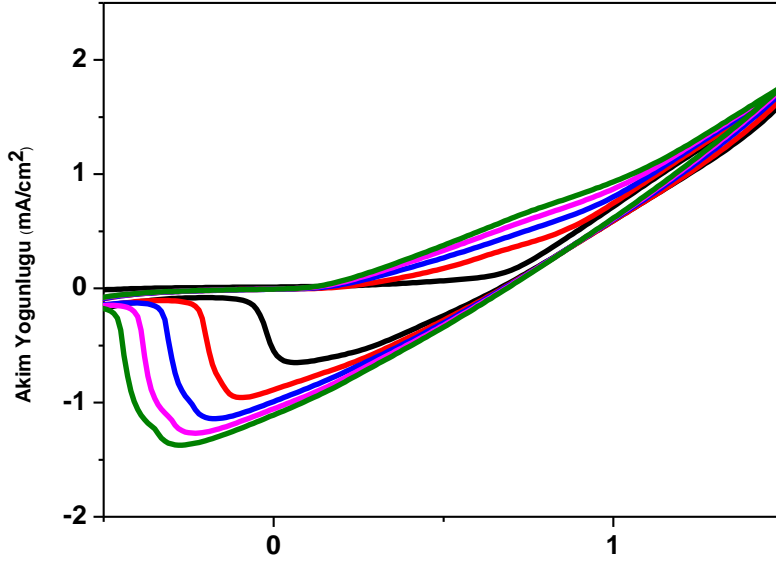
Aynı prosedür uygulanarak, 100 ml'lik bir balona 1,4-bis(2-tiyenil)bütan-1,4-dion (1g, 0,004 mol) , m-fenilen diamin (0.648 g, 0,006 mol), glasiyel asetik asit (5 ml) ve 50 ml toluen eklenmiştir. Karışım Dean-Stark tuzağıyla birlikte 4 gün boyunca reflaks edilmiş ve oluşan maddeye flash kromatografisi uygulanmıştır. % 69 verimle 3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin (RMF) monomeri sentezlenmiştir. Şekil 86'da RMF maddesinin sentez şeması gösterilmiştir. (E.N.190 °C)



Şekil 100. 3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin sentezi

4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin (RF) Elektropolimerizasyonu

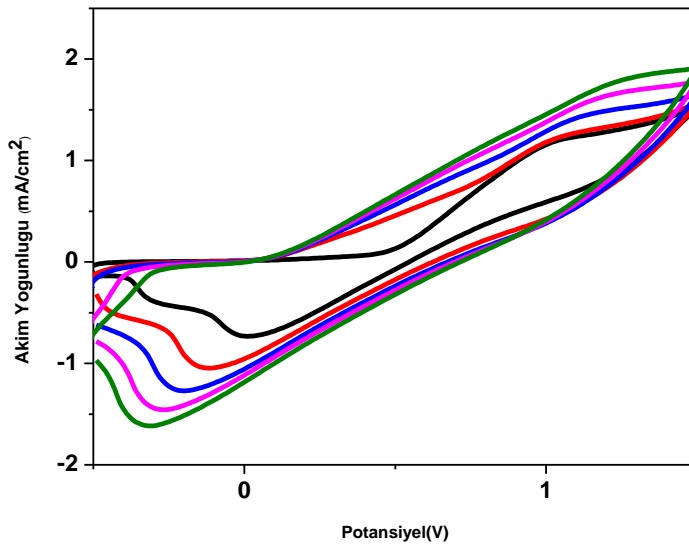
Karşit elektrot olarak Pt telin, referans elektrot olarak gümüş telin kullanıldığı hücre içinde 0.01 M RF maddesi destek elektrolit olarak 0,05 M Tetrabütülamonyumhegzaflorofosfat (TBAPF₆)' in kullanıldığı diklorometan çözücüsü içinde polimerleştirilmiştir. Dönüşümlü voltametri ile -0.5 V ile 1,5 V arasında 250 mV/s hızla tarama yapılmış ve renk değişimleri kaydedilmiştir.



Şekil 101.DCM/TBAPF₆ içerisinde 250 mV/s tarama hızıyla alınan RF maddesine ait dönüşümlü voltametri grafiği

3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-piroll-1-yl)anilin (RMF) Elektropolimerizasyonu

Karşit elektrot olarak Pt telin, referans elektrot olarak gümüş telin kullanıldığı hücre içinde 0.01 M RMF maddesi destek elektrolit olarak 0,05 M Tetrabütülamonyumhegzaflorofosfat (TBAPF₆)' in kullanıldığı diklorometan çözücüsü içinde polimerleştirilmiştir. Dönüşümlü voltametri ile -0.5 V ile 1,5 V arasında 250 mV/s hızla tarama yapılmış ve renk değişimleri kaydedilmiştir.

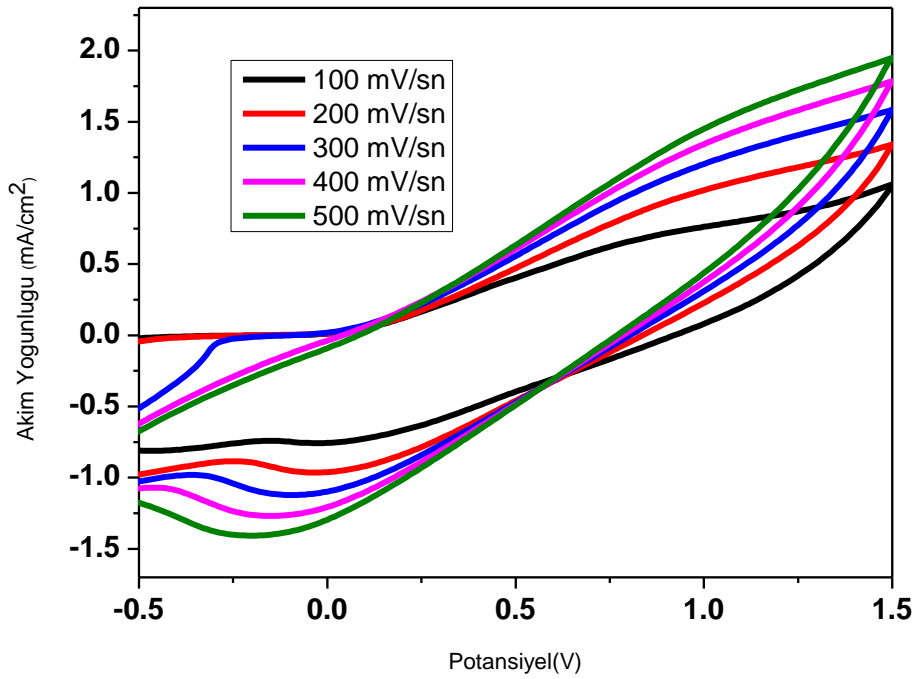


Şekil 102.DCM/TBAPF₆ içerisinde 250 mV/s tarama hızıyla alınan RMF maddesine ait dönüşümlü voltametri grafiği

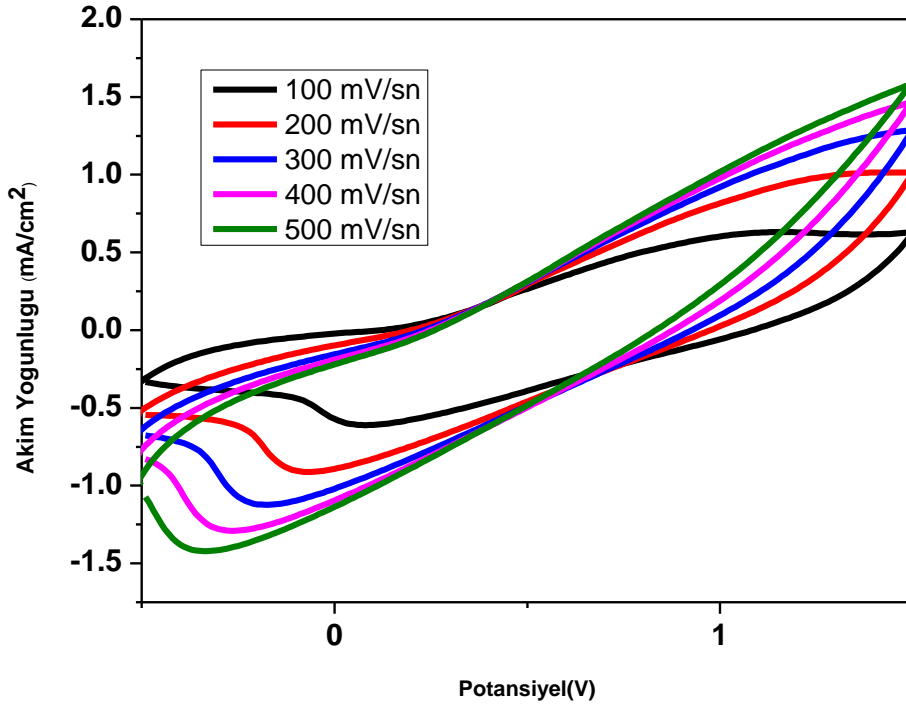
Bu grafiklerden görüldüğü gibi akım değerlerinin her döngüde artması çözeltideki monomerlerin polimerleşerek elektrot yüzeyinde iletken polimer ya da kopolimer olarak sentezlendiğini göstermektedir.

3.8.2 RF ve RMF nin Tarama Hızına Bağlı Pik Akım Değerleri

P(RF), P(RMF) nin sabit potansiyelde filmleri hazırlanarak monomer içermeyen elektrolitik çözeltide farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametrileri alınmıştır. Şekil 89 ve Şekil 90 dabelirtilen polimerlerin farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarını gösterilmektedir.



Şekil 103.P(RF) nin farklı tarama hızlarındaki CV grafiği

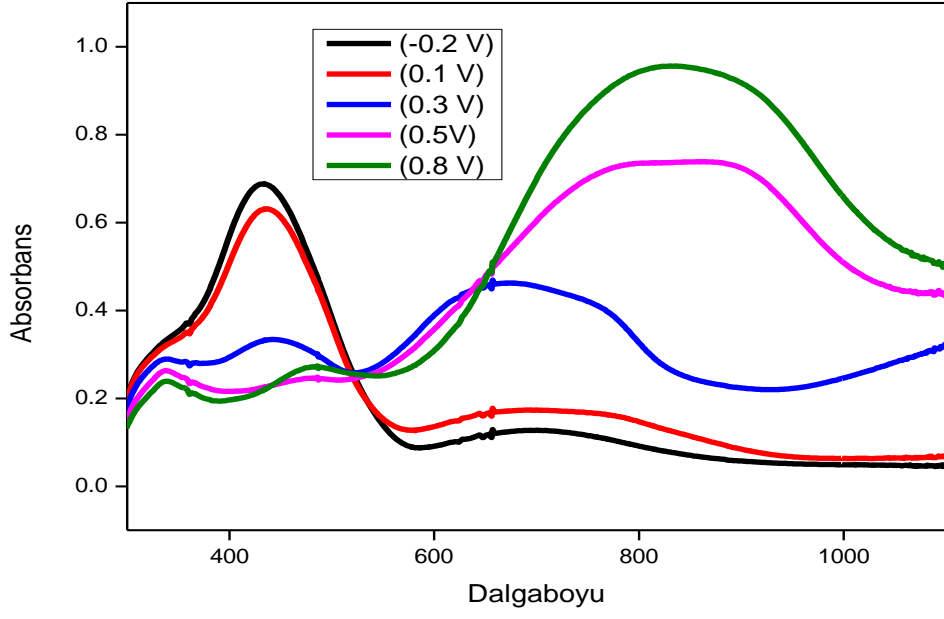


Şekil 104. P(RMF) nin farklı tarama hızlarındaki CV grafiği

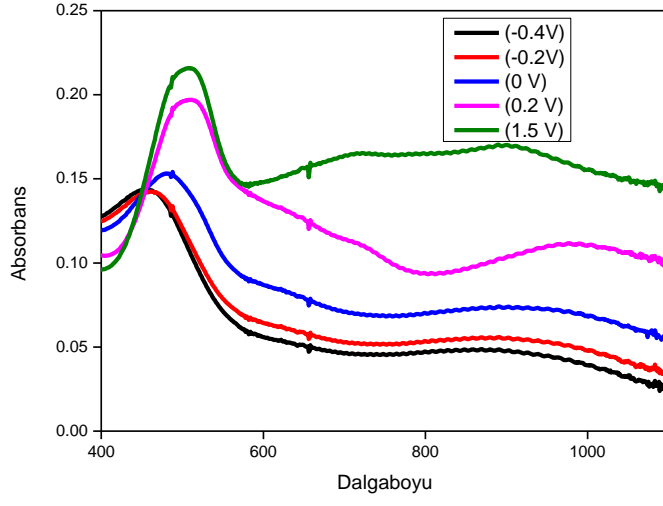
3.8.3 RF ve RMF' nin Spektroelektrokimyasal Özellikleri

Spektroelektrokimya bant aralığı (E_g) ve doping gibi polimerin elektronik yapısı hakkında bilgi verir. Bu çalışmada ilk olarak P(RF), P(RMF) filmleri 0,05 M TBAPF₆ içeren DCM çözücüsü içindeki elektrolit sistemde ITO elektrot üzerinde 1,5 V sabit potansiyel uygulanarak elektrokimyasal olarak sentezlenmiştir. Karışım monomersiz 0,05 M TBAPF₆ /DCM çözücü sisteminde farklı potansiyellerde UV-spektrumları alınmış, π - π^* geçişlerine ait maksimum dalga boyları (λ_{max}) ölçülmüştür. Heer karışımındaki renk değişimi kaydedilmiştir.

Şekil 91'de RF maddesinin UV spektrumu ve redoks renkleri verilmiştir.



Şekil 105. RF Maddesinin UV Spektrumu ve Redoks Renkleri



Şekil 106.RF Maddesinin UV Spektrumu ve Redoks Renkleri

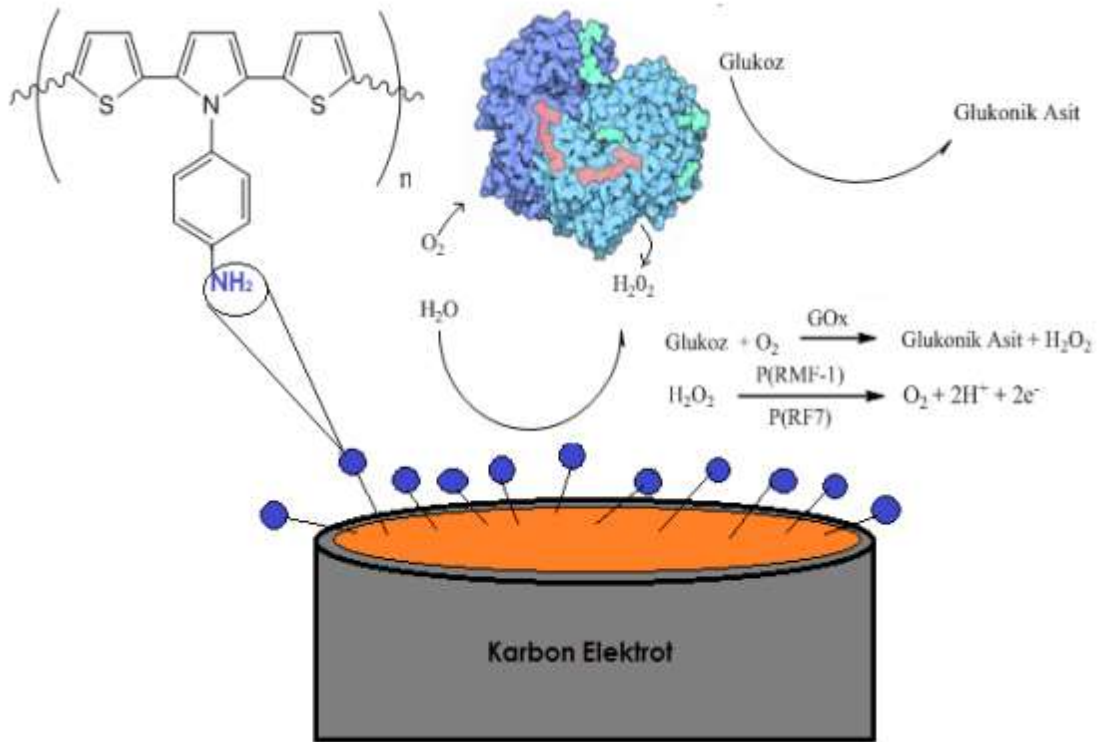
3.8.4 Biyosensör Uygulamaları

3.8.4.1 Elektrot Yüzeyine Kaplanan RF Maddesinin Optimizasyonu

5 ml Diklormetan(DCM) içerisinde 5 mg RF ve destek elektrolit olarak 0,193 g tetra bütül amonyum hekza floro fosfat(TBAPF₆) eklenerek 1,6 V sabit potansiyelde 5 dakika boyunca grafit elektrot yüzeyine kaplama yapıldı.Kaplama yüzeyinin üzerine GOx ve Gal ilave edilip kuruması için beklendi.

3.8.4.2 Elektrot Yüzeyine Kaplanan RMF Maddesinin Optimizasyonu

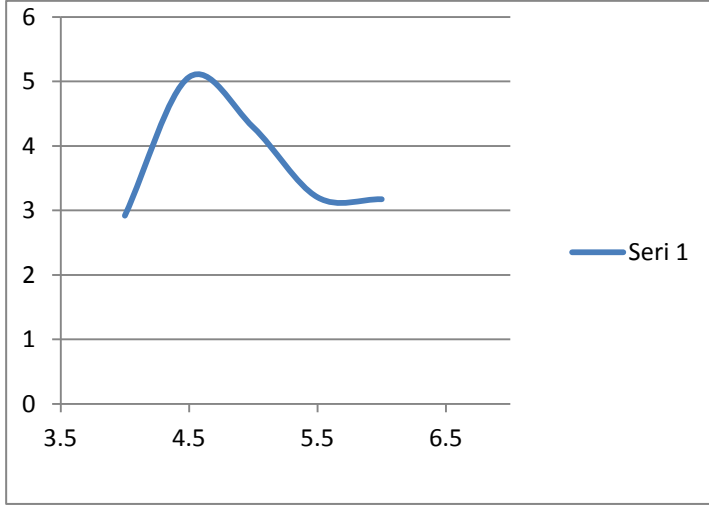
5 ml Diklormetan(DCM) içerisinde 5 mg RMF ve destek elektrolit olarak 0,193 g tetra bütül amonyum hekza floro fosfat(TBAPF₆) eklenerek 1,6 V sabit potansiyelde 5 dakika boyunca grafit elektrot yüzeyine kaplama yapıldı.Kaplama yüzeyinin üzerine GOx ve Gal ilave edilip kuruması için beklendi.



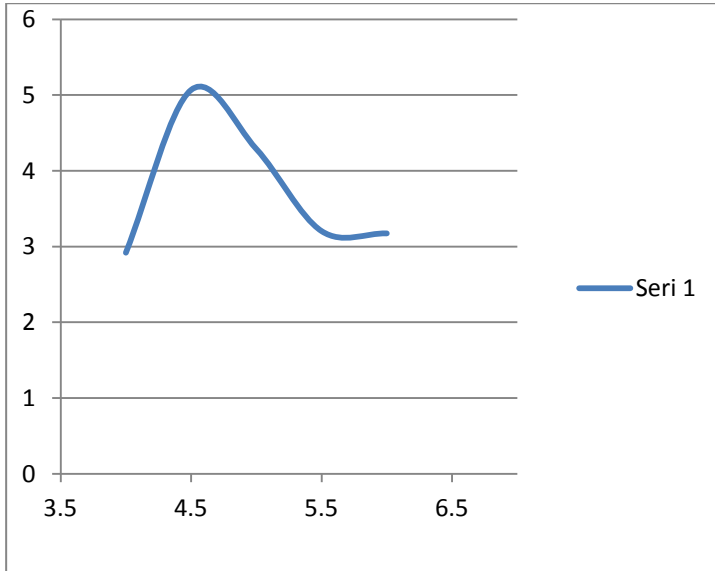
Şekil 107.Karbon elektrot üzerine RF immobilizasyonun temsili gösterimi

3.8.4.3 pH Optimizasyonu

RF ve RMF ile hazırlanan glukoz oksidaz biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla sodyum asetat tamponları kullanıldı. 50 mM konsantrasyonda sodyum asetat ve sodyum fosfat ile pH'ları 3,5 ve 6,5 arasında farklı tamponlar hazırlandı.



Şekil 108. RMF ile hazırlanan glukoz oksidaz biyosensör cevabı üzerine pH'nın etkisi (50mM; asetat tamponu; oda sıcaklığı; -700mV)

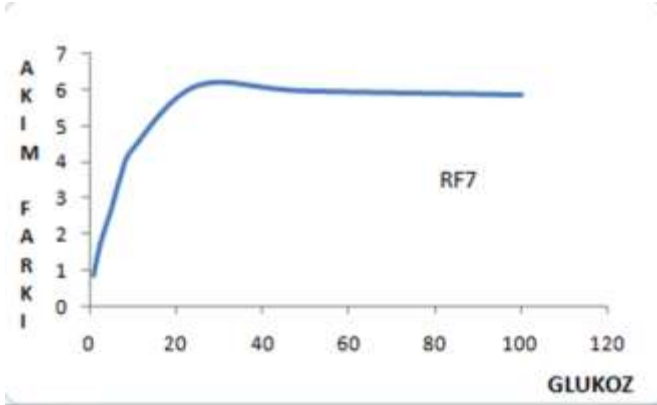


Şekil 109. RF ile hazırlanan glukoz oksidaz biyosensör cevabı üzerine pH'nın etkisi (50mM; asetat tamponu; oda sıcaklığı; -700mV)

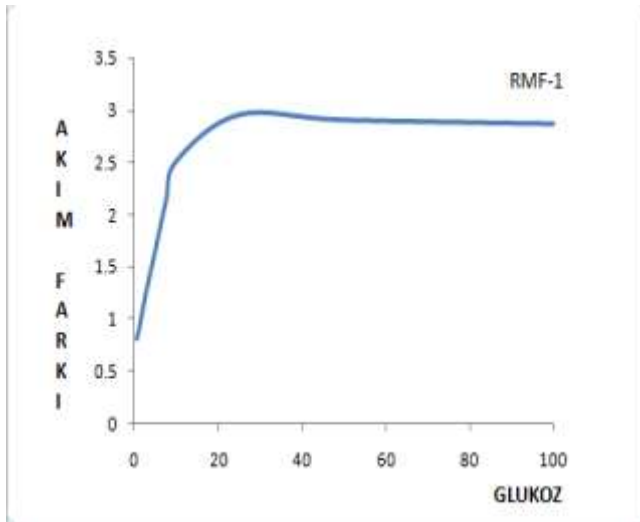
3.8.4.4 Glukoz Biyosensörünün Karakterizasyonu

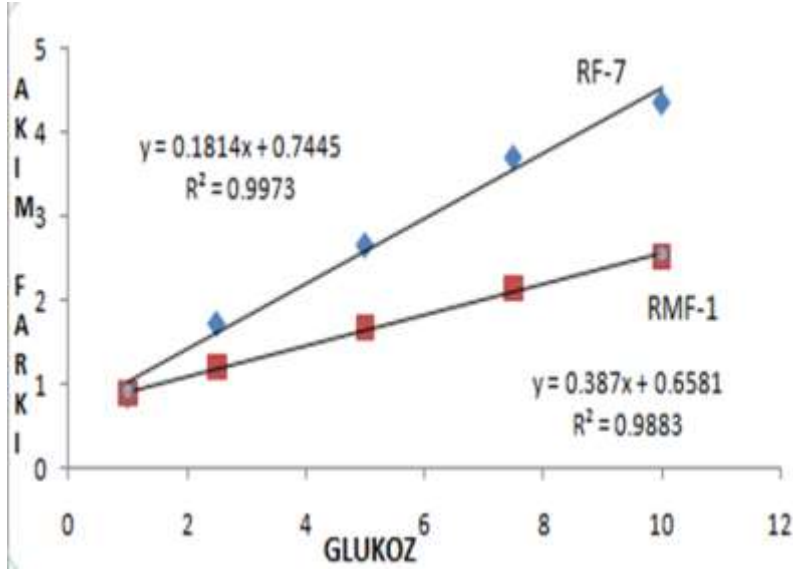
Doğrusal Tayin Aralığı

Glukoz oksidaz biyosensörünün farklı substrat konsantrasyonlarında biyosensör cevabını incelemek amacıyla glukozun farklı konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları Şekil 96 ve 98'de verilmiştir. 0,05-1,0 mM glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusallık gözlemlendi.



Şekil 110.RF ile hazırlanan glukozoksidaz biyosensörünün değişen glukoz konsantrasyonlarındaki akım değerleri (Sodyum asetat tamponu; pH 4,5; 50 mM; oda sıcaklığı; -0.7 mV)





Şekil 112. RF ile hazırlanan glukozoksidaz biyosensörünün değişen glukoz konsantrasyonlarındaki akım değerleri (Sodyum asetat tamponu; pH 4,5; 50 mM; oda sıcaklığı; -0.7 mV

3.8.4.5 Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği

Hazırlanan glukoz oksidaz biyosensörünün belirli glukoz konsantrasyonlarında çalışma tamponu ve çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirliği incelendi. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı. Bu işlemler sonrasında glukoz oksidaz biyosensörü ile glukoz standardı için standart sapması RF örneği için (S.D) ± 0.153 mM (n=10) RMF (S.D) ± 0.142 mM (n=10) örneği için olarak bulunmuştur.

3.8.4.6 Örnek Uygulama

RF ile RMF karşılaştırıldığında RF nin daha iyi sonuç gösterdiği görülmüş ve örnek uygulama sadece RF maddesine yapılmıştır. Hazırlanan glukoz oksidaz biyosensörleri ile ticari örneklerde glukoz analizine yönelik uygulanabilirliğini izlemek amacıyla kola ve gazoz örnekleri kullanılmıştır. Reaksiyon ortamına glukoz yerine içecekler seyreltme yapılmadan

eklenmiş ve ilgili standart grafiğinden örneklerdeki glukoz miktarı hesaplanmıştır. Ayrıca referans yöntem olarak spektrofotometrik bir yöntem ile örneklerdeki glukoz miktarı belirlendikten sonra sonuçlar birbiri ile kıyaslanmıştır. Alkolsüz içeceklerdeki glukoz analizinin spektrofotometrik ve glukoz biyosensörlerinin kullanımıyla elde edilen sonuçları Tablo 10 da özetlenmiştir.

Tablo 11. RF glukoz biyosensörünün örnek uygulaması

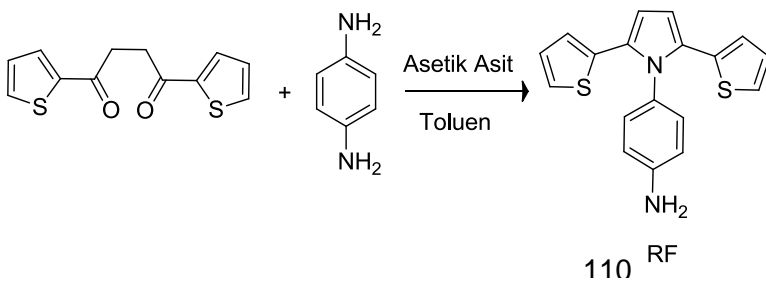
Örnek	Glukoz (mg/dL)*	
	Spektrofotometrik metod	RF/GOx
Fruko	141.75	142.85±16.82
Kola	212.4	213.40±19.87

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

3.9 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin (RF-Fc)

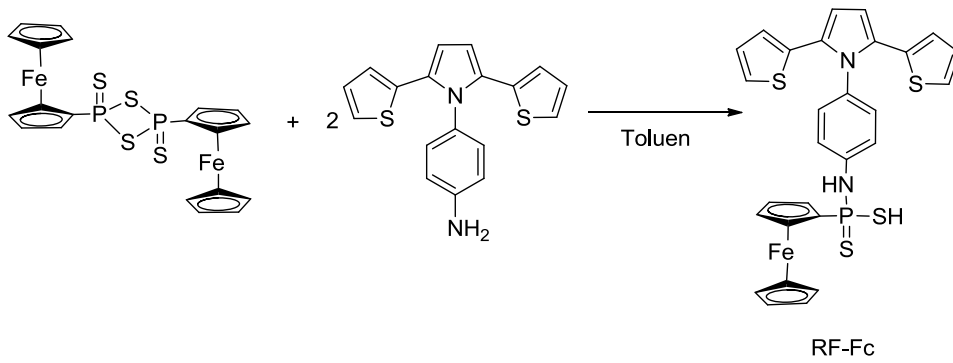
3.9.1 RF-Fc Sentezi

100 ml'lik bir balona 1,4-bis(2-tiyenil)bütan-1,4-dion (1g, 0,004 mol) , p-fenilen diamin (0.648 g, 0,006 mol), glasiyel asetik asit (5 ml) ve 50 ml toluen eklenmiştir. Karışım Dean-Stark tuzağıyla birlikte 4 gün boyunca reflaks edilmiş ve oluşan maddeye flash kromatografisi uygulanmıştır. % 76 verimle 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin (RF) monomeri sentezlenmiştir. Şekil 98 'de RF maddesinin sentez şeması gösterilmiştir. (E.N.180 °C)



Şekil 113. 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin sentezi

Sentezlenen RF maddesine ditiyofosfanat ve ferrosen içeren grup bağlanarak oluşturulan RF-Fc monomerinin sentezi Şekil 99'da gösterilmektedir. Bunun için ferrosenil ditiyadifosfetandisülfür [FcP(=S)(-S)_2] (0.21 g, 0.39 mmol) ve 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin (0.25g, 0.78 mmol) toluen (25mL) içinde karıştırıldı. Tüm katılar çözünene kadar ısıtıldı ve kahverengi bir çözelti elde edildi. Reaksiyon karışımı süzüldü ve solüsyon -18 derecede bekletildi. Oluşan sarı-turuncu kristalin ürün süzüldü ve vakum altında kurutuldu. % 60 verimle ürün elde edildi.



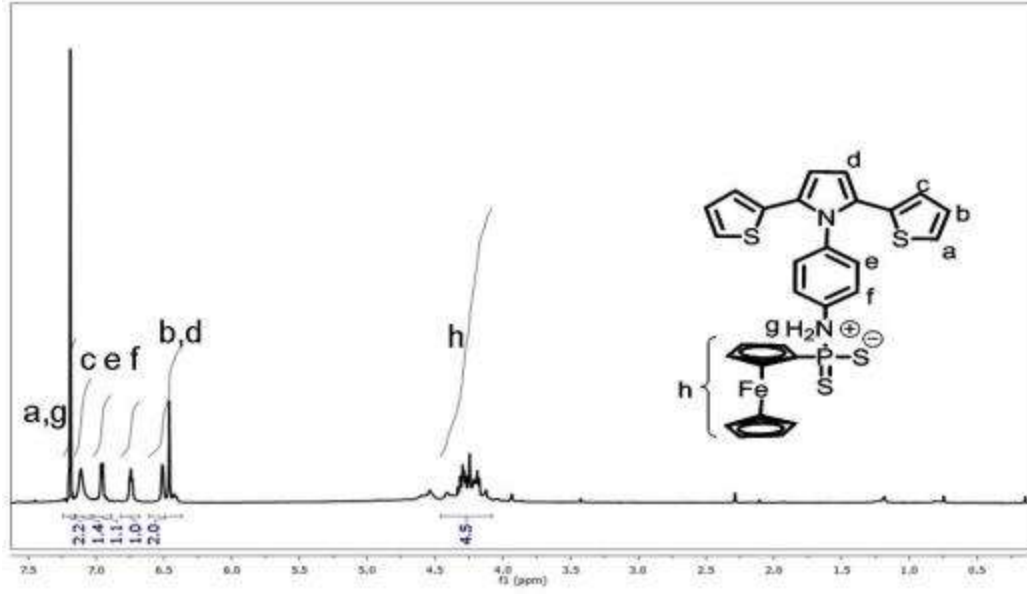
Şekil 114. 4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)amido ferrosenil ditiyofosfanat sentezi

Şekil 28.

RF-Fc Maddesinin $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu

Şekil 100'de verilen $^1\text{H-NMR}$ spektrumu için CDCl_3 solvent olarak kullanılmış ve tetrametilsilan referansına göre kimyasal kayma (δ) değerleri verilmiştir.

$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{S}_2$, $\delta\text{H ppm (CDCl}_3\text{)}$: 4.0-4.5 (m, 9H, ferrosen), 6.46 (dd, 2H, Hd), 6.58 (s, 2H, Hb) , 6.73 (dd, 2H, Hf), 6.80 (d, 2H, He), 6.97 (dd, 2H, Hc), 7.12 (d, 2H, Hb), 7.24 (4H, s, Ha,g)



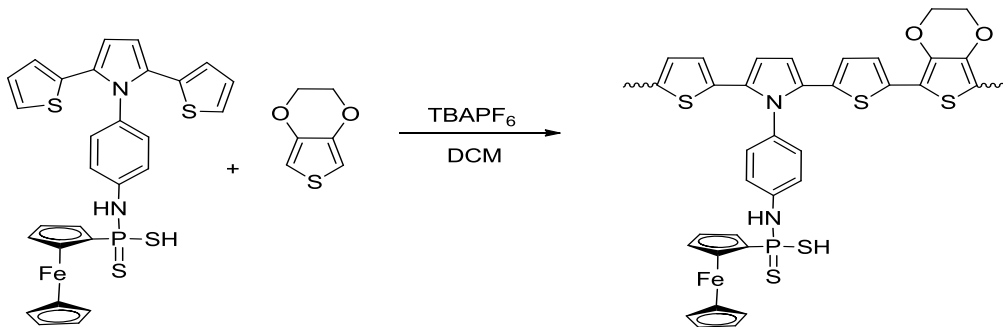
Şekil 115. RF-Fc Maddesinin 1H-NMR Spektrumu

3.9.2 RF-Fc ile 3,4-Ethylenedioxythiophene (EDOT) Kopolimerizasyonu

Sentezlenen (RF-Fc) monomeri (0.01 M) ve EDOT (0.01M) monomerinden, destek elektrolit olarak Tetrabütülamonyumhegzafloforofosfat(TBAPF₆) ve çözücü olarak da diklorometan kullanılarak EDOT miktarının giderek arttığı 4 farklı karışım hazırlanmıştır. Karışım oranları Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 12.Kopolimer Karışım Oranları

	A	B	C	D
RF-Fc (mL)	2,0	1,5	1,0	0,5
EDOT (mL)	0,5	1,0	1,5	2,0
Toplam (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5

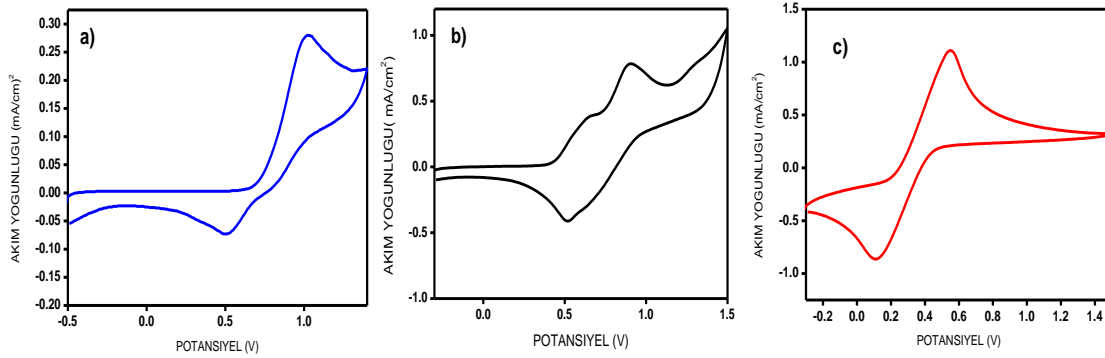


Şekil 116. RF-Fc ile EDOT kopolimerizasyonu

Bu karışımların her birine 20 saniye boyunca 1,5V'luk sabit potansiyel uygulanarak kopolimerler sentezlenmiştir. Kopolimerizasyon reaksiyonu Şekil 101'de gösterilmiştir. A,B,C,D olarak adlandırılan bu karışımların herbirine -0.5 V ile 1.5 V arasında 250 mV/s hızla dönüşümlü voltametri uygulanmış ve her bir kopolimere ait optik özellikler belirlenmiştir. Ayrıca kopolimer reaktif oranları belirlenmiş ve kopolimer bileşimi incelenmiştir.

3.9.3 Dönüşümlü Voltametri Grafikleri

Şekil 102' de RF, RF-Fc nin ve ferrosenin 0,1M TBAPF₆ içeren DCM çözeltisi içerisinde 250 mV/s tarama hızıyla alınan dönüşümlü voltametri grafikleri karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Bu grafikler incelendiğinde RF-FC'nin ferrosenin redoks pikine benzer özellik taşıyan bir redoks pik içermesi yapısında ferrosen olduğunu ve bu piklerin ferrosenin redoks pik değerlerinden farklı olması sebebiyle de ferrosenin yapıya bağlanmış olduğunu göstermektedir. Tablo 5 RF, RF-Fc ve ferrosenin CV grafiklerinde gözlenen indirgenme ve yükseltgenme pik potansiyel değerlerini göstermektedir.



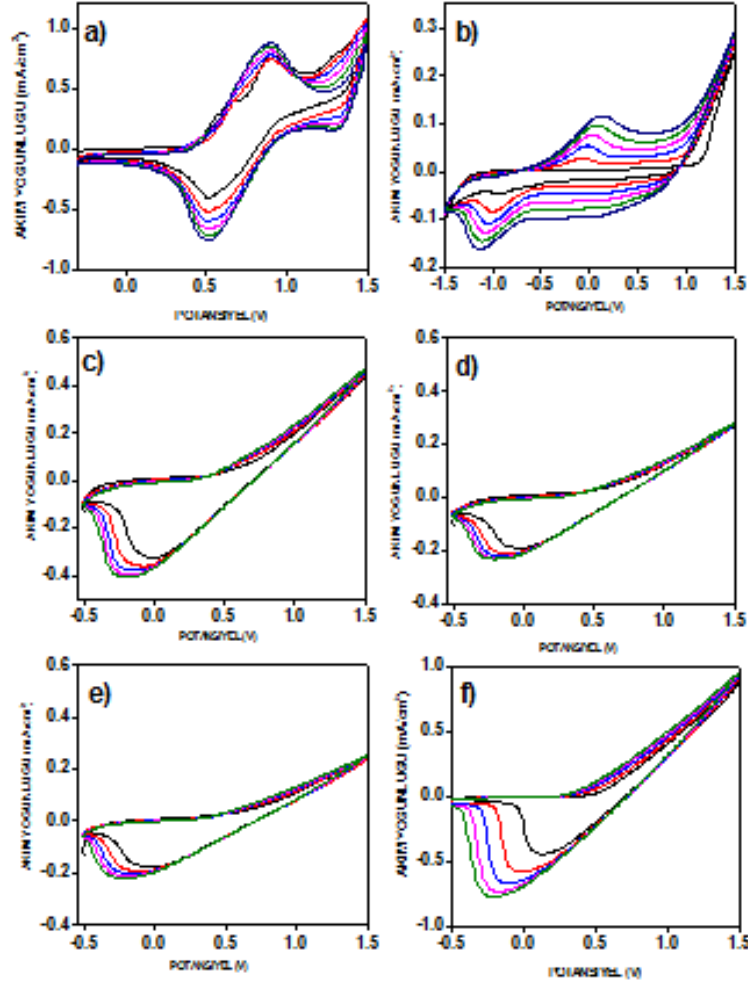
Şekil 117.DCM/TBAPF₆ içerisinde 250 mV/s tarama hızıyla alınan RF (a), RF-Fc (b) ve ferrosene (c) ait dönüşümlü voltametri grafikleri



Tablo 13. RF, RF-Fc ve Fc nin indirgenme yükseltgenme potansiyelleri

	E_{p_c} (V)	E_{p_a} (V)
RF	0.5 V	1.02 V
RF-Fc (b)	$E_{p_{c1}}= 0,65V$ $E_{p_{c2}}=0.9 V$	$E_{p_{a1}}=0,51 V$ $E_{p_{a2}}=0.95V$
Fc	0.54 V	0.11 V

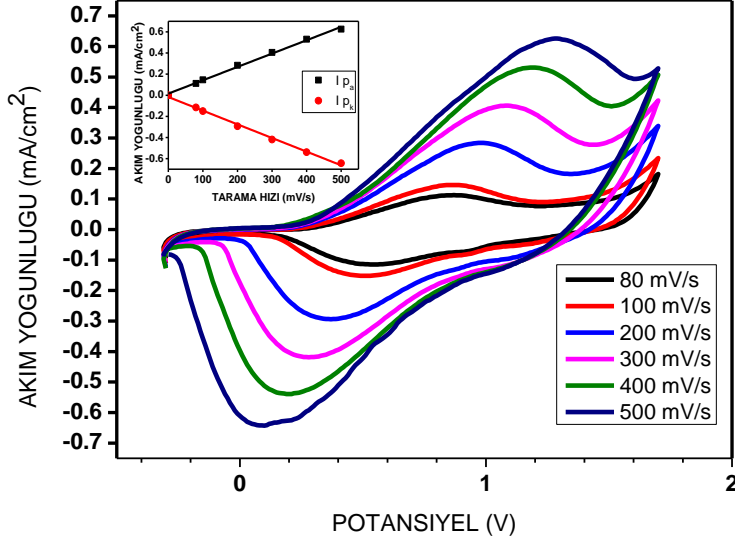
Şekil 103 DCM/TBAPF₆ içerisinde 250 mV/s tarama hızıyla alınan RF-Fc (a), EDOT(b) ve bileşimleri Tablo 4’de verilen farklı oranlara sahip RF-Fc/EDOT çözeltilerinin dönüşümlü voltametri grafiklerini göstermektedir. Bu grafiklerden görüldüğü gibi akım değerlerinin her döngüde artması çözeltideki monomerlerin polimerleşerek elektrot yüzeyinde iletken polimer ya da kopolimer olarak sentezlendiğini göstermektedir. Aynı çözücü ve elektrolit ortamında RF-Fc, EDOT ve bu iki maddenin farklı oranlarda karıştırılarak hazırlanan çözeltilerinin Şekil 103 ’de gösterilen dönüşümlü voltametri incelendiğinde ise RF-Fc ve EDOT’ a ait CV grafiklerinin şekilsel ve potansiyel değerleri bakımından hem kendi aralarında hem de karışımların CV grafiklerinden çok farklı özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuç RF-Fc ve EDOT’un farklı oranlarda karıştırılarak hazırlanan çözeltilerinin kopolimer oluşturduğunu gösteren bir kanıttır.



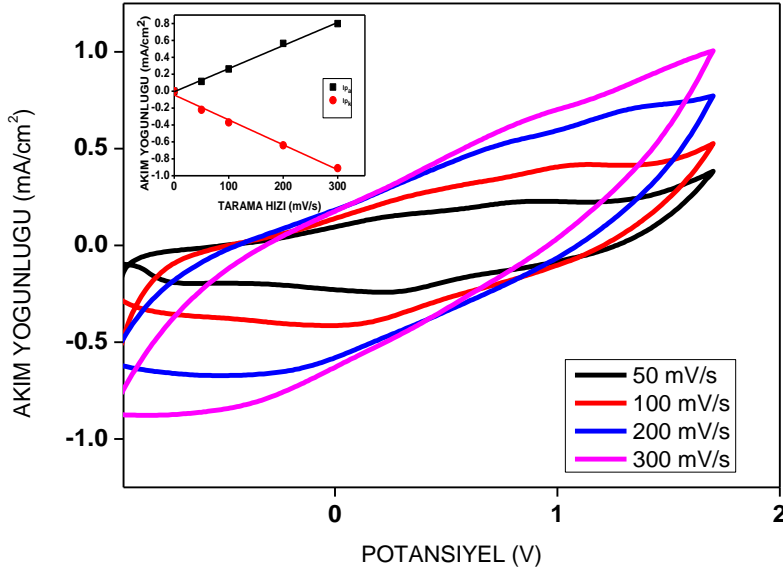
Şekil 118.a) RF-Fc b) EDOT c) A d) B e) C f) D' ye ait Dönüşümlü Voltametri grafikleri

3.9.4 Tarama Hızına Bağlı Pik Akım Değerleri

P(RF-Fc), P(RF-Fc-co-EDOT)'un sabit potansiyelde filmleri hazırlanarak monomer içermeyen elektrolitik çözeltide farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri alınmıştır. Şekil 104 ve Şekil 105' de belirtilen polimerlerin farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarını gösterilmektedir. Akım değerlerinin tarama hızlarıyla doğru orantılı olması polimer filmlerin elektroaktif olduğunu ve elektroda iyi bağlandığını göstermektedir. Şekil 104 ve Şekil 105' de içerisindeki iç grafikte de gösterildiği gibi anodik ve katodik pik akımları tarama hızının bir fonksiyonu olarak doğrusal bağımlılık göstermektedir. Bu sonuçtan yüksek tarama hızlarında bile elektrokimyasal sürecin difüzyonun kontrollü olmadığını ve tersinir bir reaksiyon olduğu kanıtlanmaktadır.



Şekil 119.P(RF-Fc) nin farklı tarama hızlarındaki CV grafiği



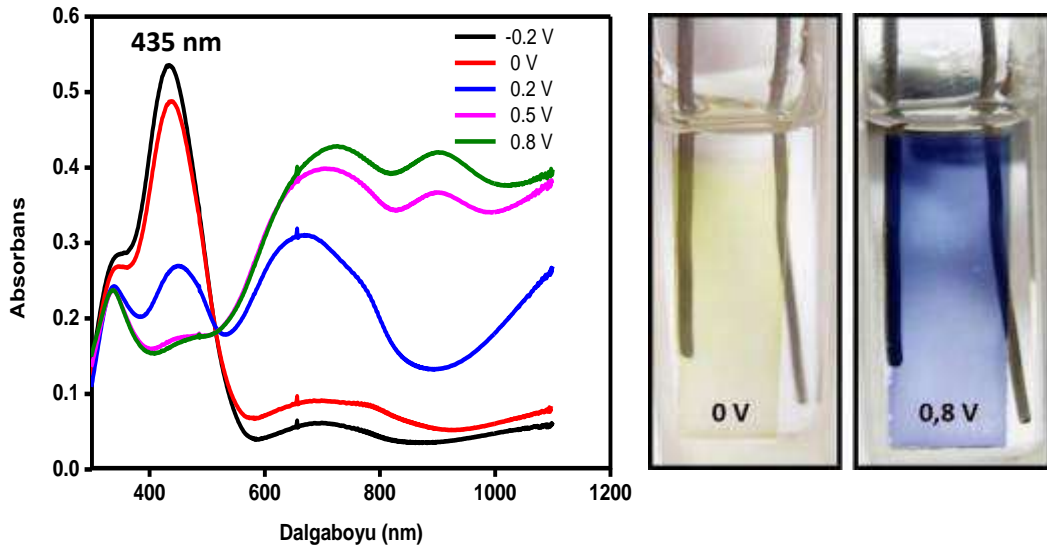
Şekil 120.P(RF-Fc-co-EDOT) un farklı tarama hızlarındaki CV grafiği

3.9.5 Spektroelektrokimyasal Özellikler

İletken polimerlerin voltaj değişimi üzerindeki optik özelliklerini incelemenin en iyi yolu spektroelektrokimya'dır. Ayrıca bant aralığı (E_g) ve doping gibi polimerin elektronik yapısı hakkında bilgi verir. Bu çalışmada ilk olarak P(RF-Fc), P(RF-Fc-co-EDOT) ve P(EDOT) filmleri 0,1 M TBAPF₆ içeren DCM çözücüsü içindeki elektrolit sistemde ITO elektrot üzerinde

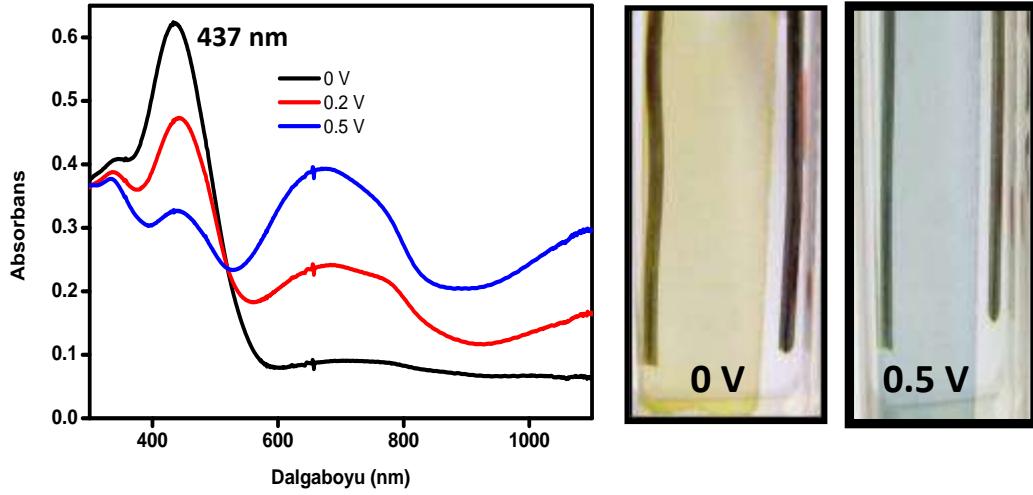
1,5 V sabit potansiyel uygulanarak elektrokimyasal olarak sentezlenmiştir. Burada herbiri 1,5 V sabit potansiyel ile kaplanan 4 farklı karışımın monomersiz 0,1 M TBAPF₆ /DCM çözücü sisteminde farklı potansiyellerde UV-spektrumları alınmış, π - π^* geçişlerine ait maksimum dalga boyları (λ_{max}) ölçülmüştür. Kopolimer reaktivite oranları belirlenmiş ve her karışımdaki renk değişimi kaydedilmiştir.

Şekil 106'da gösterilen P(RF-Fc)'nin spektroeletrokimya grafiğinden P(RF-Fc) π - π^* geçişlerine ait maksimum dalga boyu (λ_{max}) 435 nm ve bu geçişlere ait bant boşluğu enerjisi (E_g değeri) 2,31eV olarak ölçülmüştür. Bu polimere ait redoks renkleri ise sarı ve mavi olarak gözlenmiştir.



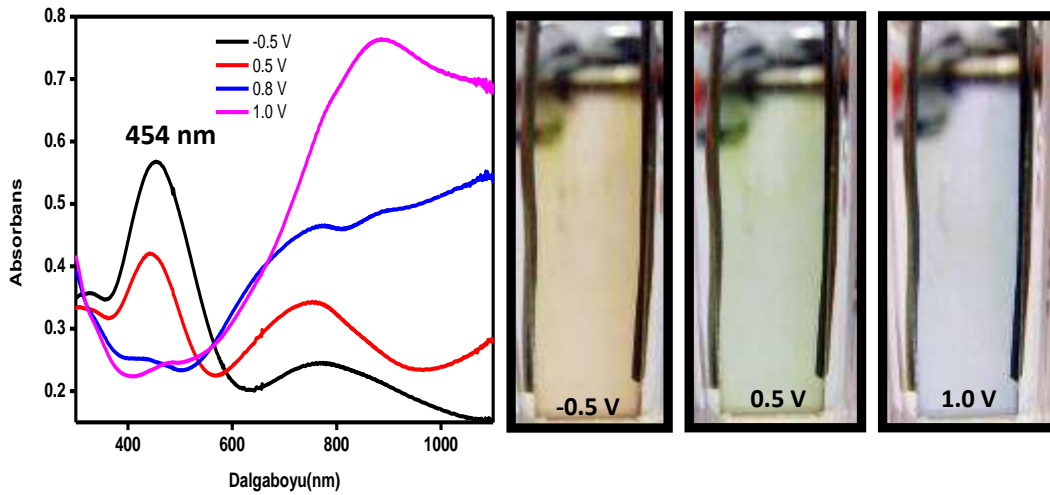
Şekil 121. P(RF-Fc)'nin Spektroeletrokimya Grafiği ve Redoks Renkleri

Şekil 107'de 0,01 M 2,0 ml RF-Fc ile 0,01 M 0,5 ml EDOT karışımından hazırlanan çözelti (A çözeltisi) kullanılarak sentezlenen kopolimere ait spektroeletrokimya grafiği gösterilmiştir. Bu kopolimere ait maksimum dalgaboyu 437 nm ve bant boşluğu enerjisi (E_g) 2,18eV olarak ölçülmüştür. A karışımı monomer besleme oranında RF-Fc miktarı EDOT'a göre daha fazla olduğu için bu çözeltiden elde edilen kopolimerin özellikleri de P(RF-Fc)'ye benzemesine rağmen bu kopolimerin redoks renkleri RF-Fc polimerinin redoks renklerinden ton değerleri bakımından farklılık göstermektedir.



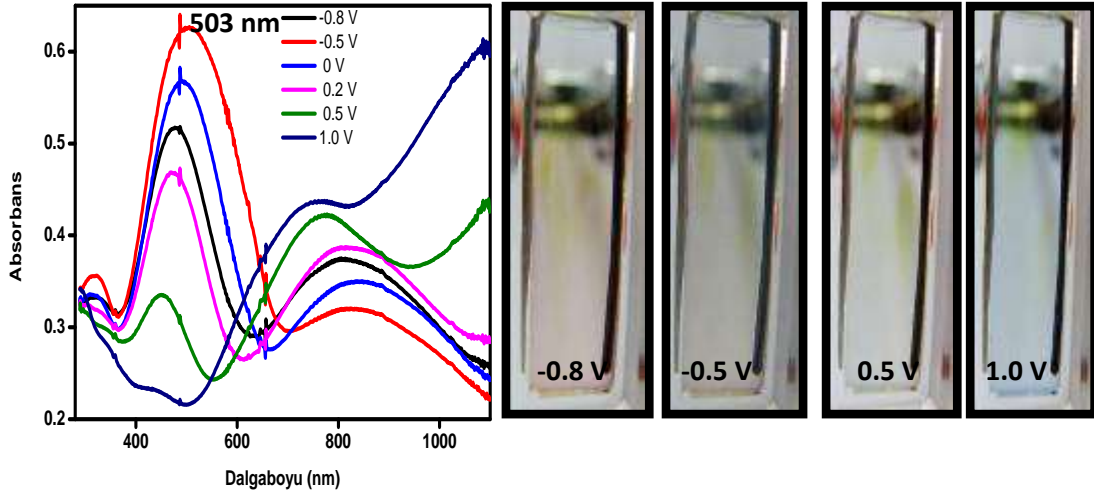
Şekil 122. A karışımından sentezlenen kopolimere ait spektroeletrokimya grafiği ve redoks renkleri

Şekil 108' de RF-Fc miktarının (0,01 M) 1.5 ml EDOT (0.01 M) miktarının 1.0 ml olduğu B karışımından sentezlenen kopolimere ait spektroeletrokimya grafiği gösterilmiştir. Bu kopolimere ait maksimum dalgaboyu 454 nm ve E_g değeri 2.0(eV) olarak hesaplanmıştır. Spektroeletrokimyasal ölçümlerde bu kopolimerin -0,5 V ile 1.0 V arasında multikromik renklere sahip olduğu gözlenmiştir.



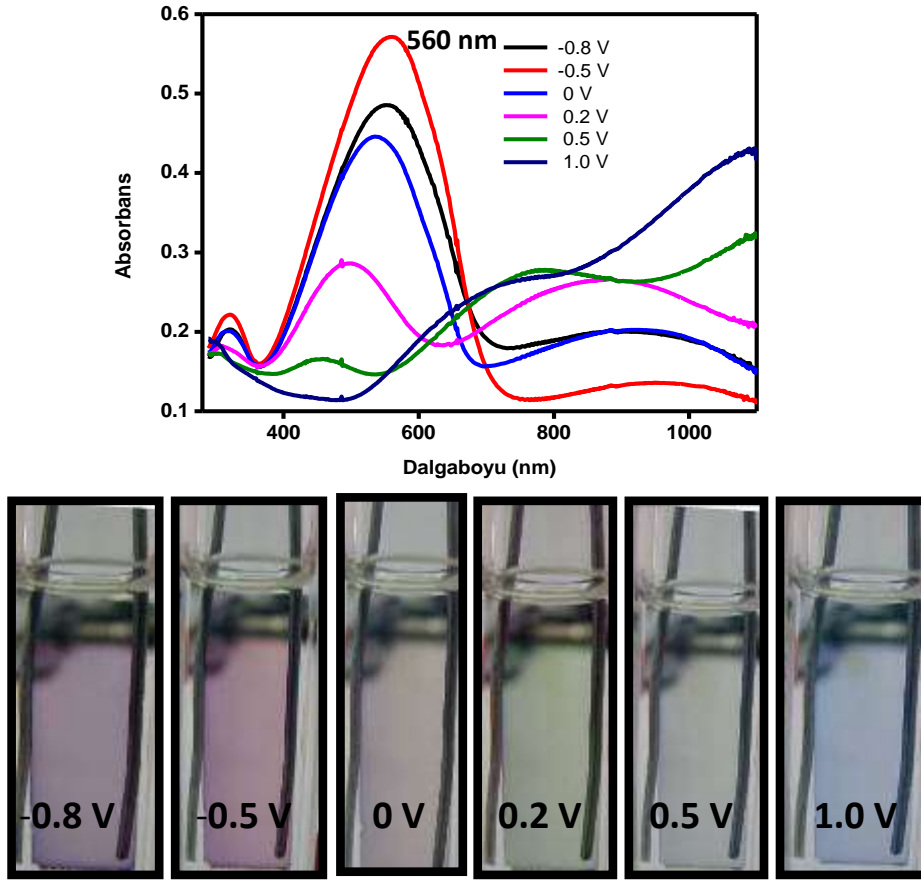
Şekil 123. B karışımından sentezlenen kopolimere ait spektroeletrokimya grafiği ve redoks renkleri

Şekil 109'da RF-Fc miktarının (0,01 M) 1.0 ml EDOT (0.01 M) miktarının 1.5 ml olduğu C karışımından sentezlenen kopolimere ait spektroeletrokimya grafiği verilmiştir. Bu grafiğe göre elde edilen kopolimerin maksimum dalgaboyu 503 nm ve E_g değeri 1.71eV olarak ölçülmüştür. Elde edilen kopolimer -0.8 V ile 1.0 V arasında multikromik renklere sahiptir.



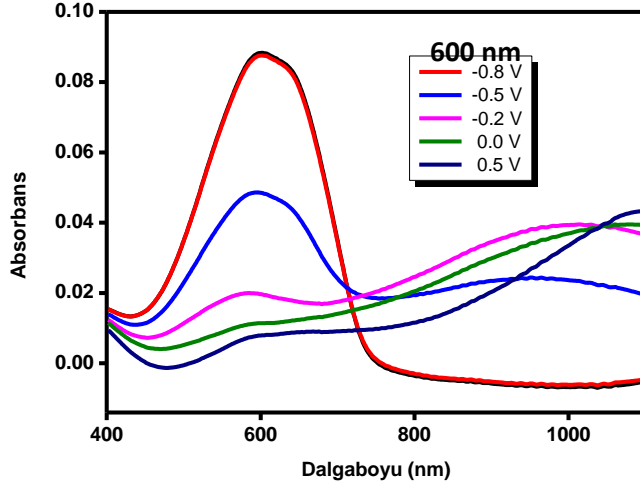
Şekil 124. C karışımından sentezlenen kopolimere ait spektroeletrokimya grafiği ve redoks renkleri

Şekil 110'da RF-Fc miktarının (0,01 M) 0,5 ml EDOT (0.01 M) miktarının 2.0 ml olduğu D karışımından sentezlenen kopolimere ait spektroeletrokimya grafiği gösterilmiştir. Bu kopolimerin π - π^* geçişine ait maksimum dalgaboyu 560 nm ve E_g değeri 1.68eV olarak hesaplanmıştır. . Elde edilen kopolimer -0.8V ile 1.0 V arasında verilen potansiyel değerine bağlı olarak 6 farklı renk gözlemlenmiştir.



Şekil 125. D karışımından sentezlenen kopolimere ait spektroeletrokimya grafiği ve redoks renkleri

Şekil 111’de elde edilen kopolimerle kıyaslama yapılabilmesi amacıyla P(EDOT)’ un spektroeletrokimya grafiği gösterilmiştir. Kopolimerlerin sentezlenmesinde kullanılan çözücü/destek elektrolit çifti kullanılarak sentezlenen PEDOT’un π - π^* geçişlerine ait maksimum dalgaboyu 600 nm olarak ölçülmüş ve E_g değeri 1.63eV olarak hesaplanmıştır.



Şekil 126.P(EDOT)un Spektroelektrokimya Grafiği

Kopolimerleri kendi aralarında ve elde edildikleri monomerlerin homopolimerleri ile karşılaştırıldığında kopolimer içerisindeki EDOT miktarı arttıkça elde edilen kopolimerlerin band boşluğu enerjisinin düştüğünü, π - π^* geçişlerine ait maksimum dalgalıplarının ise artarak PEDOT'un maksimum dalgalıboyuna yaklaştığını ve bu özelliklere bağılı olarak da kopolimerlerin multielektrokromik özellik gösterdikleri saptanmıştır.

3.9.6 Monomer besleme oranına karşı kopolimer kompozisyonunun değışimi

Bir polimerin kimyasal yapısı monomerlerin makromolekül zinciri boyunca nasıl dağıldıklarına bağılıdır. Bu dağılım her bir molekülün kopolimer oluştururken çözelti içindeki reaktivitesinin doğrudan sonucudur. Kopolimer kompozisyonunun bilinmesi maddenin hangi amaçla kullanılması için değılendirilmesinde önemli bir adımdır. Kopolimerizasyonda en yaygın matematiksel model kopolimer kompozisyonu ve monomer reaktivite oranını tespit edebilecek parametrelerin olduğu monomer besleme kompozisyonunu arasındaki ilişkiyi bulmaya dayanır. Kopolimer kompozisyonunun ve karalılığının monomer reaktivite oranıyla doğru tahmin edilmesi, kopolimerlerin gerekli fiziksel kimyasal özellikleri ile belirli uygulamalarının değılendirilmesi için oldukça önemlidir.

Farklı besleme oranlarına sahip monomer karışımlarını içeren çözeltilerin elektrokimyasal polimerleştirilmesi ile oluşan kopolimerlerin spektrokimya grafiklerinde π - π^* geçişleri ve maksimum dalga boyları λ_{max} ölçülmüştür. Bu çözeltiler için elde edilen kopolimerler ve ilgili homopolimerlerin λ_{max} değıleri karşılaştırılarak kopolimer kompozisyonları hesaplanmıştır. Hesaplama da kopolimer kompozisyonu ile π - π^* geçişlerine ait maksimum dalgalıboyunun lineer değıştiğı varsayılmıştır. Sonuçlar Tablo 13 içinde özetlenmektedir.



Tablo 14. Farklı besleme oranı içeren monomer çözeltilerinin elektrokimyasal polimerleştirilmesi ile oluşan kopolimerlerin özellikleri

Polimer	f_1	F_1	Dalgaboyu (nm)	E_g (eV)
P(RF-Fc)	1.00	1.00	435	2,31
Karışım A	0.80	0.98	437	2,18
Karışım B	0.60	0.88	454	2.00
Karışım C	0.40	0.60	503	1.71
Karışım D	0.20	0.26	560	1,68
P(EDOT)	0	0	600	1.63

Kopolimer bileşimi oranını gösteren aşağıdaki denklemde

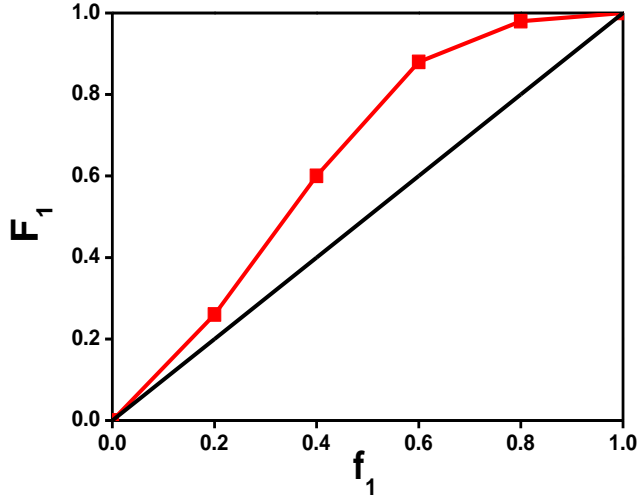
f_1 = beslemede M_1 in mol fraksiyonu f_2 = beslemede M_2 nin mol fraksiyonu

F_1 = kopolimerde M_1 in mol fraksiyonu F_2 = kopolimerde M_2 nin mol fraksiyonudur.

$$\frac{d [M_1]}{d [M_2]} = \frac{[M_1]}{[M_2]} \left(\frac{r_1 [M_1] + [M_2]}{[M_1] + r_2 [M_2]} \right)$$

Eşitlikteki derişimler kullanılarak mol kesirleri hesaplanırsa r_1 ve r_2 ye ulaşır. r_1 ve r_2 değerleri kopolimerizasyon şekli ve bileşimi hakkında bilgi verir.

$r_1=r_2=1$, rastgele kopolimer, ideal kopolimerizasyona $r_1=0$, $r_2=0$ ardışık polimerlere örnek gösterilebilir.



Şekil 127. P(RF-Fc-co-EDOT) kopolimerleri için monomer besleme oranına (f_1) karşı kopolimer kompozisyonları (F_1) grafiği

RF-Fc (monomer 1) ve EDOT (monomer 2) kopolimerizasyonu için kopolimer bileşimi F_1 e karşı monomer besleme oranı f_1 değerleri kullanılarak çizilen grafik Şekil 112' de gösterilmiştir. Kopolimerlerin optik özellikleri kopolimer kompozisyona bağlıdır. Kopolimerlerin optik özelliklerinin lineer olarak değiştiği düşünülürse, kopolimer kompozisyonunda kolayca hesaplanabileceği düşünülmüş ve bu amaçla elektropolimerizasyonla elde edilen her bir kopolimerin π - π^* geçişleri ve λ_{max} değerleri karşılaştırılarak kopolimer kompozisyonları tahmin edilmiştir.

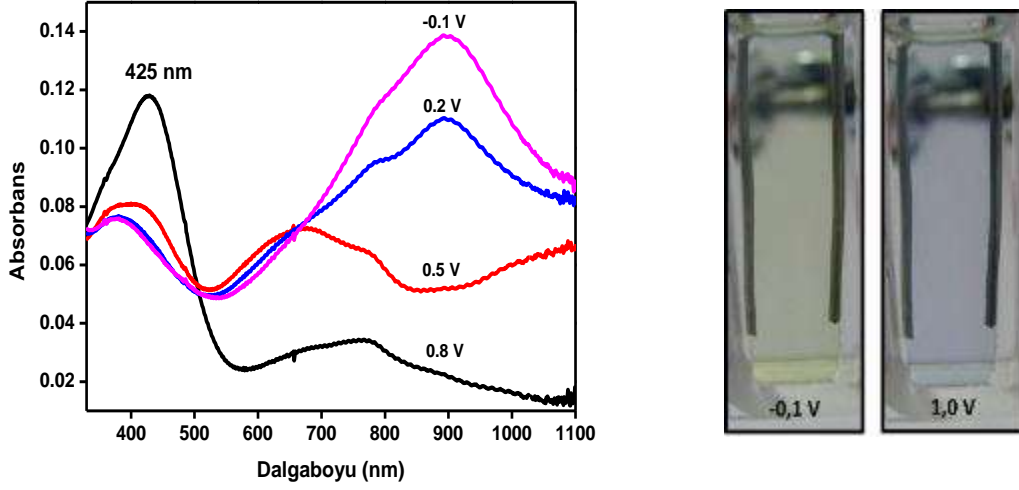
Bu grafikte kopolimer reaktif oranı hesaplanmış ve RF-Fc miktarının düşük olduğu karışımlardan elde edilen kopolimer bileşiminin rastgele kopolimere (ideal kopolimerizasyon) daha yakın olduğu saptanmıştır.

3.9.7 Kopolimerleşmeye Uygulanan Polimerleşme Potansiyelin Etkisi

Belli bir monomer besleme oranı seçilerek hazırlanan çözeltilere farklı potansiyeller uygulanarak kopolimerleşmeye uygulanan polimerleşme potansiyelinin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla kopolimerleşmenin en etkin olduğu ve 0,5/1,5 RF-Fc/EDOT oranı içeren karışım D seçilmiştir.

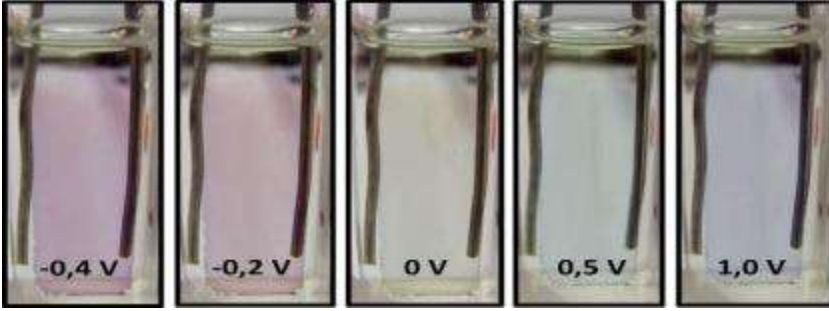
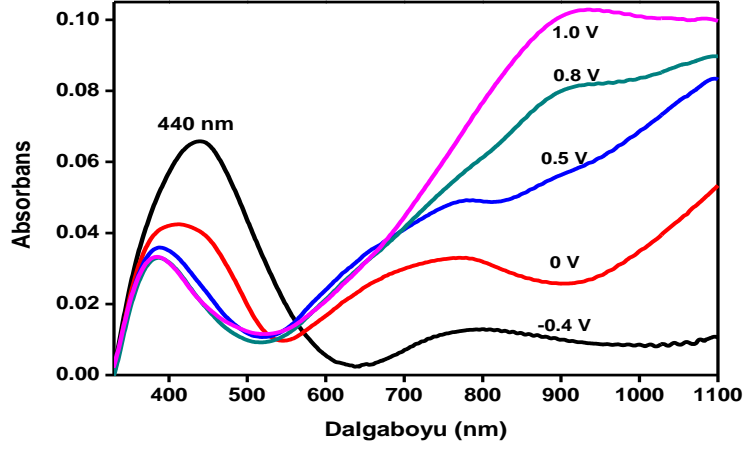
Çalışmada D çözeltisine sırasıyla 1.0V, 1.3V ve 1.5V sabit potansiyeller uygulanarak her potansiyel değerine ait kopolimerler elde edilmiştir. Elde edilen kopolimerler 0,1M TBAPF6/DCM sistemi içinde spektroeletrokimyasal ölçümler yapılarak optik özellikleri incelenmiştir.

Şekil 113' de 1.0 V sabit potansiyelde sentezlenen P(RF-Fc-co-EDOT) kopolimerine ait spektroeletrokimya grafiği gösterilmiştir. Maksimum dalgaboyu 425 nm E_g değeri 2.26(eV) olarak hesaplanmıştır.



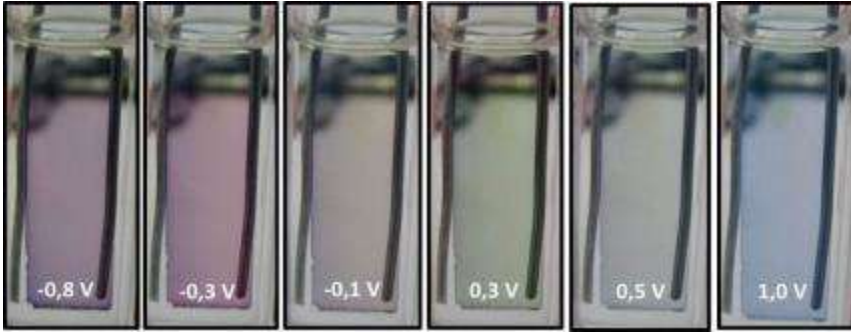
Şekil 128. P(RF-Fc-co-EDOT)' un 1.0 V sabit potansiyeldeki spektroeletrokimyası

Şekil 114' de P(RF-Fc-co-EDOT)'un 1.3V sabit potansiyelde sentezlenen kopolimere ait spektroeletrokimya grafiği gösterilmiştir. Bu kopolimere ait maksimum dalgaboyu 440 nm ve E_g değeri 2.10eV olarak hesaplanmıştır. -0.4 V ve 1.0 V arasında multikromik renk gözlenmiştir.



Şekil 129. P(RF-Fc-co-EDOT) D karışımının 1.3 V sabit potansiyeldeki spektroeletrokimyası

Şekil 115'de 1.5V sabit potansiyelde sentezlenen kopolimere ait spektroeletrokimya grafiği gösterilmiştir. Maksimum dalgaboyu 560 nm ve E_g değeri 1,68eV olarak ölçülmüştür. Kopolimer -0.8 V ve 1.0 V arasında multikromik renk gözlenmiştir.



Şekil 130. P(RF-Fc-co-EDOT) D karışımının 1.5 V sabit potansiyeldeki spektroeletrokimyası

Tablo 15. Polimerleştirme potansiyelinin kopolimerleşmeye etkisi

Polimer	λ_{\max}	$E_g(\text{eV})$
P(RF-Fc)	435	2.31
Kopolimer I (1.0V)	425	2.26
Kopolimer II (1.3V)	440	2.10
Kopolimer III (1.5V)	560	1.68
P(EDOT)	600	1.63

Tablo 7 de kopolimer I, II, III için λ_{\max} ve $E_g(\text{eV})$ değerleri verilmiştir. Kopolimerleşmeye uygulanan potansiyelin etkisini incelemek amacıyla aynı monomer besleme oranına sahip çözeltilere farklı polimerleşme potansiyelleri uygulanarak elde edilen kopolimerlerin optik özellikleri incelendiğinde aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur;

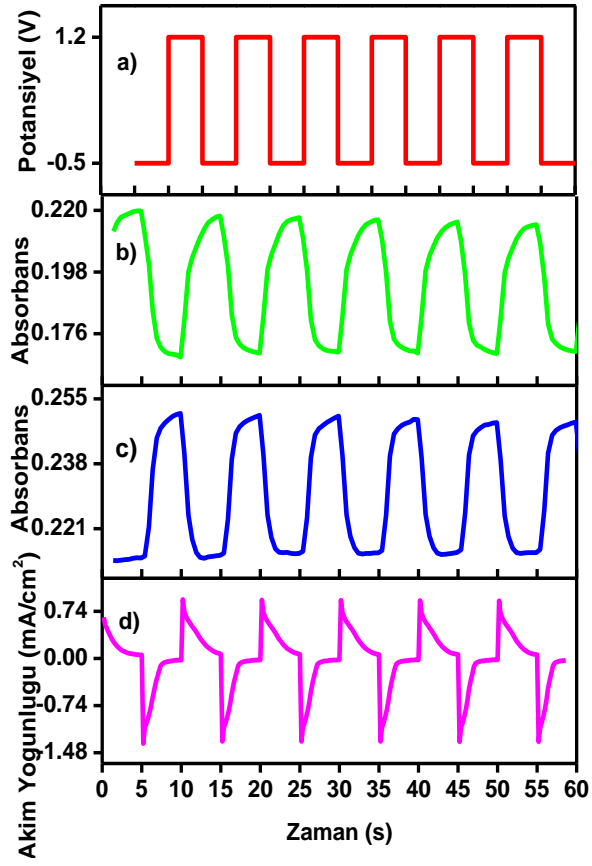


- a- Kopolimerleşmeye, uygulanan polimerleşme potansiyelinin etkisi büyüktür.
- b- Polimerleştirme potansiyeli arttıkça band boşluğu enerjisi düşmektedir.
- c- Polimerleşme potansiyeli arttıkça kopolimer yapısına daha fazla EDOT girmektedir.
- d- Düşük polimerleşme potansiyellerinde zincir uzaması yeterince gerçekleşemediğinden polimer yerine oligomerler oluşmakta ve bu nedenle de $\pi-\pi^*$ geçişlerine ait maksimum dalga boyu hopolimer yapılarından bile küçük kalmaktadır.
- e- Uygulanan potansiyel arttıkça elde edilen kopolimerin multielektrokromik özelliği ortaya çıkmaktadır.

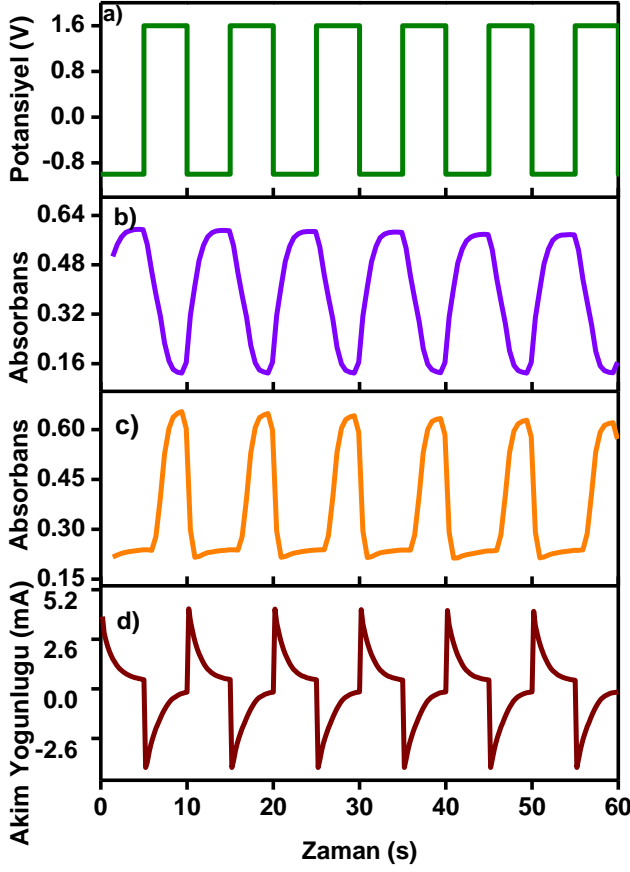
3.9.8 Tepki Zamanı

Dalgaboyundaki geçirgenlik değişimi ile polimerin redoks bölgeleri arasındaki tepkime zamanı spektroeletrokimyasal olarak belirlenmiştir. Polimer filmin tepki süresini saptamak için kronoamperometrik çift potansiyel yöntemi uygulanmıştır. Polimer filmin tamamen oksitlenmiş ve nötral halleri arasında 5 saniyede bir potansiyel verilmiştir. P(RF-Fc) için maksimum kontrast elde edilen dalga boyları olan 430 nm ve 700 nm de ve polimerin indirgenme ve yükseltgenme potansiyelleri olan -0.5V +1.2 V arasında 5 saniyede bir potansiyel verilmiştir ve Şekil 116'da zamana karşı çizilen potansiyel, absorbans ve akım grafikleri gösterilmiştir. P(RF-Fc co-EDOT) için maksimum kontrast elde edilen dalga boyları olan 550 nm ve 1000 nm de ve polimerin indirgenme ve yükseltgenme potansiyelleri olan -1.0V +1.6 V arasında 5 saniyede bir potansiyel verilmiştir Şekil 117'de zamana karşı çizilen potansiyel, absorbans ve akım grafikleri gösterilmiştir.

P(RF-Fc) için 800 nm de tepki zamanı 2,5s 430 nm için 1,5s olarak P(RF-Fc-co-EDOT) için 1000 nm için 2,2s 550 nm için 1.98 s olarak ölçülmüştür.



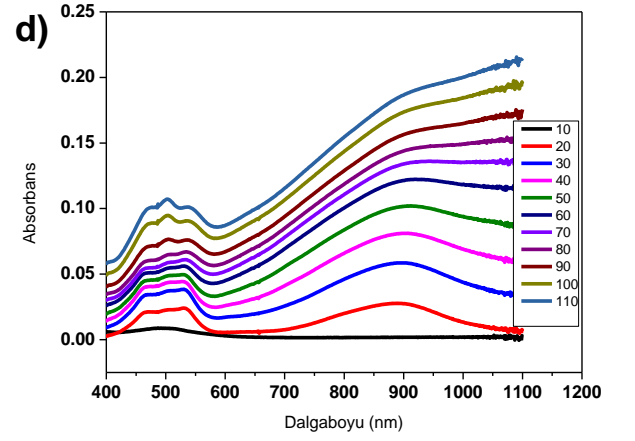
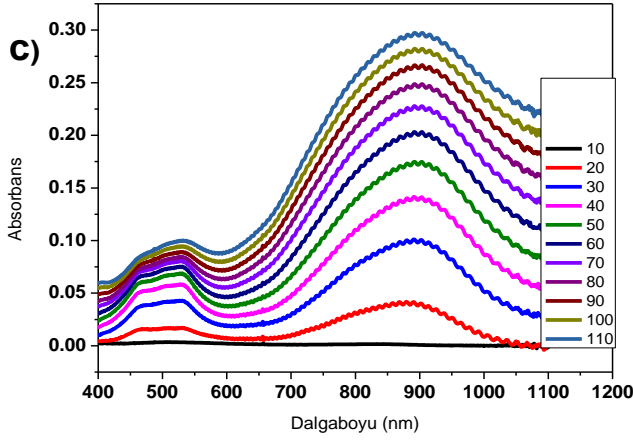
Şekil 131. P(RF-Fc) için a) Potansiyel-Zaman b) 700 nm için Absorbans-Zaman c) 430 nm için Absorbans-Zaman d) Akım-Zaman Grafikleri



Şekil 132. P(RF-Fc-co-EDOT) için a) Potansiyel-Zaman b)1000 nm için Absorbans-Zaman c) 550 nm için Absorbans-Zaman d) Akım-Zaman Grafikleri

3.9.9 In-Situ Polimerizasyon

A, B, C, D karışımlarının her birine her 10 saniyede bir 1.5 V sabit potansiyel verilerek UV-vis spektrofotometrede in- situ elektrokimyasal kopolimerizasyonları araştırılmış absorbsiyona karşı dalgaboyu grafikleri çizilmiştir. Zaman arttıkça elektrot yüzeyinde kaplanan kopolimer miktarı artmış dolayısıyla da absorbans değerleri artmıştır. Her bir kopolimere ait in-situ kopolimerleşme dalga boylarının aynı olması kopolimerleşme mekanizmasının monomer besleme oranına bağlı olmadığını göstermektedir.

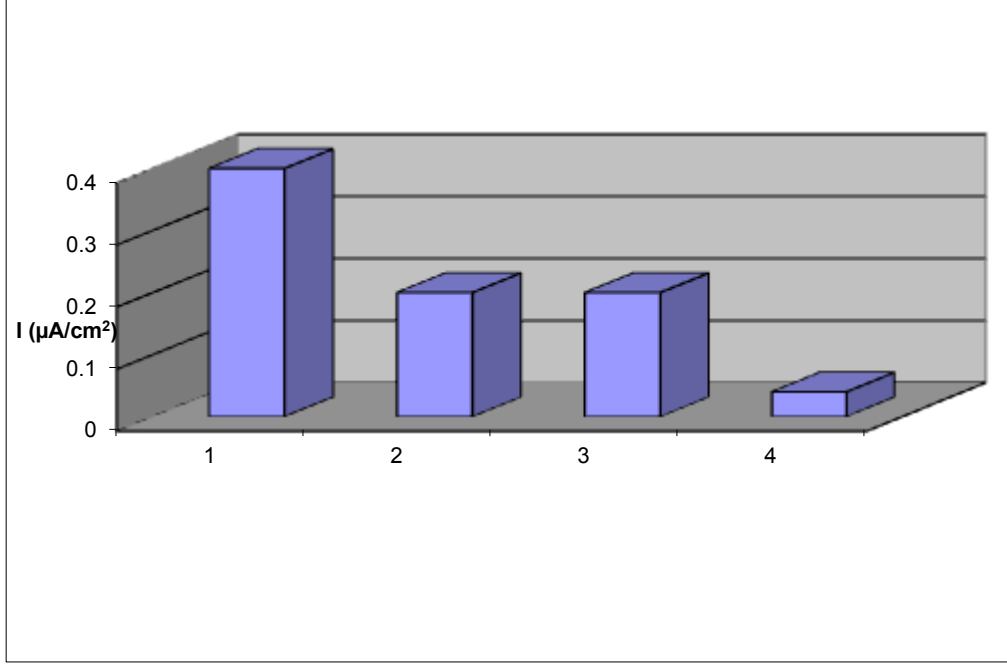


Şekil 133. a) A b) B c) C d) D Karışımlarının In-situ polimerizasyonları

3.9.10 Biyosensör Çalışmaları

3.9.10.1 Elektrot Yüzeyine Kaplanan Kopolimer Oranının Optimizasyonu

Bu çalışmada elektrot yüzeyine kaplanan kopolimer oranları değiştirilerek biyosensör hazırlanmış ve bu oranların biyosensör cevabı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Bu amaca yönelik olarak; biyosensör hazırlanmasında kullanılan 1mg RF/ 1 mg RF-Fc, 0.5 mg RF/ 4.5 mg RF-Fc, 1 RF mg/ 4 mg RF-Fc, 2 mg RF/ 3 mg RF-Fc kopolimer oranlarıyla biyosensör cevabı arasındaki ilişki Şekil 119'da verilmiştir. En iyi biyosensör cevabı 1 mg RF/ 4 mg RF-Fc ile hazırlanan biyosensörde görülmüştür.



Şekil 134. Biyosensör cevabı üzerine biriktirme süresinin etkisi (Sodyum asetat tamponu; pH 4,5; 50 mM; oda sıcaklığı -0.7 mV; RF/RFFc (mg/mg monomer miktarı) oranları için 1: 1 mg/4 mg; 2: 2 mg/3 mg; 3: 0,5 mg/4,5 mg; 4: 5 mg/5mg).

3.9.10.2 pH Optimizasyonu

Glukoz oksidaz biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla sodyum asetat tamponları kullanıldı. 50 mM konsantrasyonda sodyum asetat ve sodyum fosfat ile pH'ları 3,5 ve 6,5 arasında farklı tamponlar hazırlandı. En iyi cevap pH 4,5; 50 mM asetat tamponunda alındı.

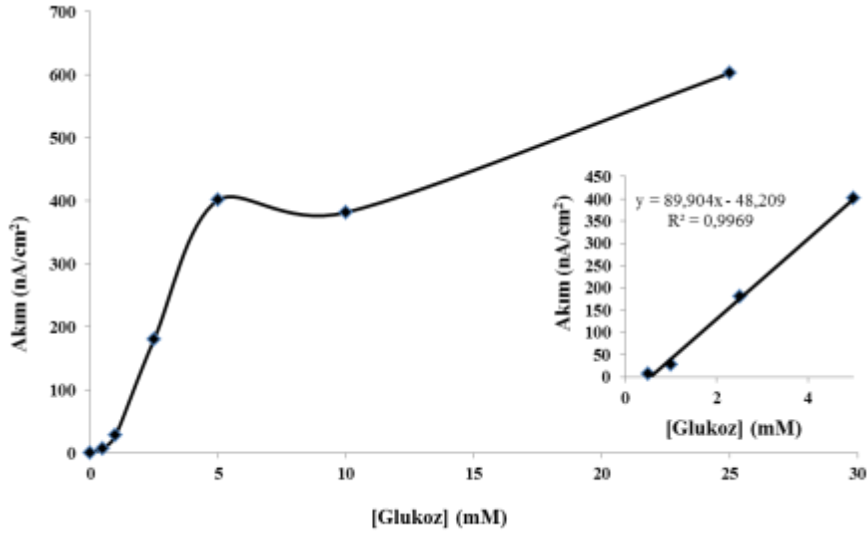


Şekil 135. Biyosensör cevabı üzerine pH'nın etkisi (50mM; asetat tamponu; oda sıcaklığı; -700mV)

3.9.10.3 Glukoz Biyosensörünün Karakterizasyonu

Doğrusal Tayin Aralığı

Glukoz oksidaz biyosensörünün farklı substrat konsantrasyonlarında biyosensör cevabını incelemek amacıyla glukozun farklı konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları Şekil 121 'de verilmiştir. 0,05-1,0 mM glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusallık gözlemlendi.



Şekil 136. Glukoz oksidaz biyosensörlerinin değişen glukoz konsantrasyonlarındaki akım değerleri (Sodyum asetat tamponu; pH 4,5; 50 mM; oda sıcaklığı; -0.7 mV)

Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği

Hazırlanan glukoz oksidaz biyosensörünün belirli glukoz konsantrasyonlarında çalışma tamponu ve çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirliği incelendi. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı. Bu işlemler sonrasında glukoz oksidaz biyosensörü ile glukoz standardı için standart sapma (S.D) ± 0.103 mM (n=5) ve varyasyon katsayısı (c.v) % 5,0 olarak bulundu.

Örnek Uygulama

Hazırlanan glukoz oksidaz biyosensörleri ile ticari örneklerde glukoz analizine yönelik uygulanabilirliğini izlemek amacıyla kola ve gazoz örnekleri kullanılmıştır. Reaksiyon ortamına glukoz yerine içecekler seyreltme yapılmadan eklenmiş ve ilgili standart grafiğinden örneklerdeki glukoz miktarı hesaplanmıştır. Ayrıca referans yöntem olarak spektrofotometrik bir yöntem ile örneklerdeki glukoz miktarı belirlendikten sonra sonuçlar birbiri ile kıyaslanmıştır. Alkolsüz içeceklerdeki glukoz analizinin spektrofotometrik ve glukoz biyosensörlerinin kullanımıyla elde edilen sonuçları Tablo 8'de özetlenmiştir.



Tablo 16. Glukoz oksidaz biyosensörleri ve spektrofotometrik yöntem kullanılarak iki farklı örnekte glukoz analizi.

Örnek	Glukoz (g/l)*	
	Spektrofotometrik metod	Glukoz oksidaz biyosensörü
Coca Cola	70,0±3,0	69,1±1,9
Sprite	54,2±9,3	55,7±1,7

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).



SONUÇ

O-2-(tiyofen-3-yl)etil-ferrosenilditiyofosfonat (THFc) %58 verimle sentezlenmiş, bileşik ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve ^{31}P -NMR ile karakterize edilmiştir. (THFc) tiyofen (Th) ile karşılaştırılmış ferrosenilditiyofosfonat grubunun kimyasal yapıya bağlanma etkisi araştırılmıştır. (THFc) ve (TH)'nin sadece Bortriflorid:dietileter kompleksi (BFEE) içerisinde ilave destek elektrolit kullanılmadan dönüşümlü voltametrileri alınmıştır. Dönüşümlü voltametriler karşılaştırıldığında (THFc)'de ferrosenin spesifik piki gözlenmiştir. Polimerlerin yüzey özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Aynı ana zincire sahip oldukları için P(ThFc) ve P(Th)'in SEM görüntüleri benzerdir. Ancak P(ThFc)'nin SEM görüntüsü P(Th)'ye oranla daha pürüzsüz bir yapıdadır.

P(ThFc)'nin spektroelektrokimyasal özelliklerini incelemek amacıyla P(ThFc) sabit 1,5 V potansiyel altında ITO elektrot üzerinde film halinde kaplanarak sentezlenmiştir. P(ThFc)'nin politiyofen anazincirine ait 320-600 nm aralığında (417 nm'de maksimum ile) absorpsiyonuna ek olarak, ferrosen gruplarının borontriflorürdietileterat (BFEE) grubu ile etkileşiminden kaynaklanan 600-800 nm aralığında bir absorpsiyon gözlenmiştir. Spektroelektrokimya çalışmaları P(ThFc)'nin π^* elektronik geçişinden kaynaklanan 2,14 eV büyüklüğünde band boşluğu enerjisi olduğunu göstermektedir. P(ThFc) nötral ve yükseltgenmiş halleri için sırasıyla yeşil ve mavi renklerine sahiptir.

Polimerizasyon çözücü sisteminin araştırılması çalışmalarında; ferrosen grubu ile hem çözücü hemde destek elektrolit görevi yapan BFEE arasında kalıcı bir etkileşimin olduğu fark edilmiştir. Bu etkileşim sonucunda 600-800 nm arasında ilave bir absorpsiyon gözlenmiştir. Dolayısıyla politiyofen anazincirinin 370 nm deki absorpsiyonuna ek olarak 600-800 nm arasındaki ferrosen-BFEE etkileşimi absorpsiyonu sebebiyle P(ThFc) nötral halde yeşil renktedir. Bilindiği gibi aynı yapıda iki farklı absorpsiyonun gerekmesi sebebiyle nötral halde yeşil renkli polimer elde etmek oldukça zordur. Literatürde nötral halde mavi ve kırmızı renkli birçok polimerin bulunmasına rağmen ana renklerin üçüncü ayağı olan yeşil renkli polimer oldukça sınırlıdır. P(Th) nötral ve yükseltgenmiş halleri için sırasıylakırmızı ve mavi renklerine sahiptir.

O-2-(tiyofen-3-yl)etilferrosenilditiyofosfonat (ThFc) Nikel Kompleksi (ThFc-Ni) %48 verimle sentezlenmiştir. ThFc-Ni ^1H -NMR ve ^{31}P -NMR spektrumları ile karakterize edilmiştir.

P(ThFc-Ni-co-Th) filmi, ThFc-Ni (0.05 M) ve Th (0.01) içeren ACN içerisinde, ITO üzerinde, 1.8 V sabit potansiyelde sentezlenmiştir ve ardından monomer içermeyen BFEE çözeltisi içerisinde spektroelektrokimyasal çalışmalar yapılmıştır. P(ThFc-Ni-co-Th) polimerine ait



sırasıyla nötral ve yükseltgenmiş halde sarı ve mavi arasında renk değişikliği olduğu saptanmıştır.

4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)bütan-1-amin (TPA) %53 verimle sentezlenmiştir. Sentezlenen madde ¹H-NMR ile karakterize edilmiştir. P(TPA)'nın ACN-DCM içerisinde LiClO₄ destek elektrolit varlığında dönüşümlü voltametri alınarak elektrokimyasal polimerleştirilmesi gerçekleştirilmiştir.

P(TPA)'nın sabit potansiyelde filmi hazırlanarak, monomer içermeyen elektrolitik çözeltide farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri alınmıştır. Akım değerlerinin tarama hızlarıyla doğru orantılı olması polimer filmin elektroaktif olduğunu ve elektroda iyi bağlandığını göstermektedir. P(TPA)'nın μ - μ^* geçişine ait band boşluğu enerjisi 2,7 eV' dur. Nötral durumda sarı yükseltgenmiş halde ise mavi renklidir.

TPA ve EDOT monomerleri P(TPA-co-EDOT) polimerini oluşturmak üzere kopolimerleştirilmiştir. P(TPA), P(EDOT) ve P(EDOT-TPA)'nın dönüşümlü voltametri alınmış ve grafikler karşılaştırıldığında 3 grafiğinde farklı olması kopolimerleşmenin olduğunu kanıtlamıştır.

P(TPA) ve P(TPA-co-EDOT) için anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızının bir fonksiyonu olarak doğrusal değişim göstermiştir. Bu grafikler elektrokimyasal prosesin difüzyon kontrollü olmadığını ve yüksek tarama hızlarında bile tersinir olduğunu göstermektedir.

P(TPA-co-EDOT)'nın μ - μ^* geçişine ait band boşluğu enerjisi 1.59 eV' dur. Nötral durumda sarı yükseltgenmiş halde ise mavi renklidir. P(TPA)'nın nötral ve yükseltgenmiş haldeki renkleri mavi ve sarı iken; bu monomerin EDOT'la kopolimerinin (P(TPA-co-EDOT)) nötral ve yükseltgenmiş halleri arasında toplam sekiz farklı renk oluşmaktadır.

Elde edilen filmlerin iletkenlikleri dört nokta temas yöntemi ile ölçülmüştür. P(TPA), PEDOT ve kopolimer P(TPA-co-EDOT) filmlerinin iletkenlikleri Tablo 1' de verilmiştir. PEDOT 0.1 Scm⁻¹ gibi iyi bir iletkenlik gösterirken, P(TPA)'nın iletkenliği 3.0x10⁻³ Scm⁻¹ dir. Tablo 1'den de görüleceği gibi (P(TPA-co-EDOT)'un iletkenliği P(TPA) ve PEDOT' un iletkenliklerinin arasında çıkmıştır. EDOT ünitelerinin P(TPA)'nın yapısına girmesiyle iletkenlikte artışa sebep olmuş ve P(TPA)'nın potansiyel uygulama alanlarını genişletmiştir.

P(TPA) ya da P(TPA-co-EDOT) ve PEDOT filmleri elektrokimyasal olarak ITO kaplı cam elektrot yüzeylerine kaplanmış ve arada jel elektrolit olacak şekilde iki polimer kaplı cam



elektrot (biri yükseltgenmiş halde iken diğeri indirgenmiş halde) yapıştırılarak ECDs sandwich konformasyonunda hazırlamıştır.

Spektroelektrokimyasal sonuçlardan 0.0V'da P(TPA) katmanı nötral durumda iken PEDOT katmanı yükseltgenmiş durumda olduğu ve cihazın renginin bu nedenle sarı olduğu saptanmıştır. Uygulanan potansiyel yükseldikçe P(TPA) katmanı yükseltgenirken PEDOT katmanı indirgenmektedir. Bu sebeple 1,6 V'da indirgenmiş PEDOT'un mavi rengi ve yükseltgenmiş P(TPA) da mavi renginden dolayı cihaz mavi renklidir.

P(TPA-co-EDOT)/PEDOT elektrokromik cihazının farklı potansiyelerde alınan UV spektrumlarından oluşan spektrokromik grafikte pozitif potansiyelerde yaklaşık 580 nm'de $\pi-\pi^*$ geçişinden kaynaklanan pik gözlenir. Bu durumda PEDOT UV-vis bölgesinde herhangi bir absorpsiyon gözlenmez. Negatif potansiyelerde anodik olarak renklenen P(TPA-co-EDOT) $\pi-\pi^*$ geçiş absorpsiyonu azalırken PEDOT katmanının indirgenmesiyle 615 nm'de yeni bir absorpsiyon gözlenir. Açık gri renk -0.2V'da gözlenirken, açık yeşil renk ise 0.4 V'da gözlenir.

P(TPA) cihazı için 0.0 V ve +1.6 V arasında 5 s. süreyle yapılan ölçümlerde maksimum kontrast ($\Delta T\%$) ve tepki zamanı 20% ve 1.3 s olarak ölçülmüştür. (Şekil 30). P(TPA-co-EDOT) cihazı için tepki zamanı ve $\Delta T\%$ değerleri -1.0 V ve +1.5 V arasında yapılan ölçümler sonucunda 0.8 s and 25 % olarak ölçülmüştür.

Bis(4-(3-tiyeniletilen)-oksikarbonil) diazobenze (TDAZO) literatüre göre kantitatif verimle sentezlenmiştir. Monomer¹H-NMR ve FTIR ile karakterize edilmiştir.

Dönüşümlü Voltamogramlar TDAZO, politiyofen, tiyofen varlığında TDAZO' nun dönüşümlü voltmetrileri karşılaştırılmıştır. TDAZO'nun CV'nda redoks piklerin yoksunluğundan öncü monomerin elektroaktif olmadığı anlaşılmıştır. Reaksiyon ortamına Th'ın ilavesinden sonra, artan tarama sayısı ile birlikte redoks piklerindedeki artış görülmüştür. Döngü sayısının belirli bir akım değerine kadar saf tiyofenden farklı olduğu gözlenmiştir.

TDAZO'nun sırasıyla DCM ve ACN içerisindeki fotoizomerizasyon hız sabitleri 0.195 ve 0.308'dir. Isıtma işlemiyle, cis-trans isomerizasyonu, 230 nm'deki absorpsiyonda bir artışa sebep olurken, 328 nm'deki absorpsiyonda düşüşe yol açmaktadır.

$\pi-\pi^*$ geçişlerine ait (elektronik bant boşluğu) enerji başlangıcı 1.95 eV ve λ_{max} 439 nm olarak bulunmuştur.



Hidroksikarbazol ferrosenilditiyofosfanat (Cz-Fc) %34 verimle sentezlenmiştir. Sırasıyla, 2-Hidroksi karbazol (Cz), 2-Hidroksi karbazolferrosenilditiyofosfat (Cz-Fc) ve ferrosenin dönüşümlü voltametri grafikleri alınmış ve Cz-Fc'nin ferrosenin redoks pikine benzer özellik taşıyan bir redoks pik içermesi yapısında ferrosen olduğunu ve bu piklerin ferrosenin redoks pik değerlerinden farklı olması sebebiyle de ferrosenin yapıya bağlanmış olduğunu göstermektedir.

P(Cz-Fc)'nin spektrokimya grafiğinden P(Cz-Fc)'nin $\pi-\pi^*$ geçişlerine ait maksimum dalga boyu (λ_{max}) 600 nm olarak ölçülmüştür. Bu polimere ait redoks renkleri ise açık yeşil ve mavi olarak gözlenmiştir.

Cz-Fc için ikinci olarak bor trifloriddieterat (BFEE) içinde elektrokimyasal polimerleştirme gerçekleştirilmiştir. Bu şartlar altında BFEE sadece çözücü olarak kullanılmamış aynı zamanda destek elektrolit olarak kullanılmıştır. BFEE' nin polimerleşmeye etkisini incelemek amacıyla sırasıyla 1/2 ACN+1/2 BFEE ve tamamen BFEE sistemleri içinde dönüşümlü voltametri ve UV spektrumları incelenmiştir. P(Cz-Fc)'nin spektrokimya grafiğinden, P(Cz-Fc) $\pi-\pi^*$ geçişlerine ait maksimum dalga boyu (λ_{max}) 670 nm olarak ölçülmüştür. Bu polimere ait redoks renkleri ise transparent ve mavi olarak gözlenmiştir.

2-butyl-5,12-dihidro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]quinoxaline (BuDQP) %65 verimle sentezlenmiştir. Sentezlenen monomer H^1 -NMR, MS, IR(ATR) ve C^{13} -NMR ile karakterize edilmiştir. BuDQP'un elektrokimyasal oksidatif polimerizasyonu PC içinde TBAFP destek elektroliti ile potansiyodinamik metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

P(BuDQP) için $\pi-\pi^*$ geçişleri maksimum dalga boyunun (λ_{max}) 328 nm olduğu gözlenmiş ve band aralığı 2.3 eV olarak hesaplanmıştır. P(BuDQP) tamamen indirgendiğinde açık sarı, tamamen yükseltildiğinde ise mavi renk göstermiştir.

Maddenin farklı monomerle kombinasyonu elektrokromik uygulama açısından önemli olmuştur. Kopolimerizasyon sonucu multielektrokromik özellik gözlenmiştir.

P(BuDQP-co-Py) için $\pi-\pi^*$ geçişleri maksimum dalga boyunun (λ_{max}) 346 nm olduğu gözlenmiş ve band aralığı 2.24 eV olarak hesaplanmıştır. P(BuDQP-co-Py) redoks potansiyellerinde 6 farklı rengeyle multielektrokromik özellik göstermiştir. Bu özellikler akıllı pencere gibi optoelektronik aygıtlar için aktif tabaka olarak kullanılabilirlikte oldukça önemlidir.

Copolymerization of distinct monomer scan lead to an interesting combination of the properties observed in the corresponding homopolymers and is a logical approach for color fine-tuning with a view to electrochromic applications. The P(BuDQP-co-Py) film has an



electronic band gap (due to π - π^* transition) of 2.24 eV at 346 nm. Furthermore, the copolymer films are multielectrochromic, exhibiting six distinct colors depending on the applied potential, not to mention their high absorption in the NIR region. These features are interesting for application of this material as active layer in optoelectronic devices, such as displays and smart windows.

4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)bütan-1-amin (HKCN) %53 verimle sentezlenmiştir. Sentezlenen monomer H^1 -NMR ve C^{13} -NMR ile karakterize edilmiştir. P(HKCN)' nin 0.1 M TBP₆/DCM çözücü sisteminde dönüşümlü voltametri alınarak elektrokimyasal polimerleştirilmesi gerçekleştirilmiştir.

P(HKCN)' nin sabit potansiyelde filmi hazırlanarak monomer içermeyen elektrolit içeren çözeltide farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri alınmıştır. Alınan akım değerlerinin tarama hızlarıyla doğru orantılı olması polimer filmlerin elektroaktif olduğunu ve elektroda iyi bağlandığını göstermektedir. Anodik ve katodik pik akımları tarama hızının bir fonksiyonu olarak doğrusal bağımlılık göstermektedir. Bu sonuçtan yüksek tarama hızlarında bile elektrokimyasal sürecin difüzyonun kontrollü olmadığını fakat tersinir bir reaksiyon olduğunu kanıtlanmaktadır.

P(HKCN) için π - π^* geçişleri maksimum dalga boyunun (λ_{max}) 445 nm olduğunu gözlenmiş ve bandaralığı 1.95 eV olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar literatürdeki diğer SNS türevleri ile kıyaslandığında, bu yeni tipi SNS türevinin π - π^* geçişinde yüksek dalga boyuna ve düşük band aralığı enerjisine sahip olduğu anlaşılmıştır. Bilindiği üzere, elektron verici gruplar HOMO enerji düzeyi artırmaktadır. Yapılan incelemeler sonucunda azot atomunun konjuge SNS halkasına sağladığı elektron transferinden dolayı daha düşük band aralıklı polimerin elde edilebildiği sonucu çıkmaktadır.

Polimer filmin tepki süresini saptamak için kronoamperometrik çift potansiyel yöntemi uygulanmıştır. P(HKCN) için bu değerler -0.5V +1.0 V arasında 5 saniyede bir potansiyel verildiğinde maksimum kontrast ve tepki zamanı 800 nm için %36 ve 2.5 s ve 445 nm için %18 ve 3s olarak ölçülmüştür.

Kopolimer kompozisyonunun ve karalılığının monomer reaktivite oranıyla hesaplamak amacıyla bir yöntem uygulanmıştır. . Bu amaçla elektropolimerizasyonla elde edilen her bir kopolimerin π - π^* geçişleri ve λ_{max} değerleri karşılaştırılarak kopolimer kompozisyonları tahmin edilmiştir. HKCN için radikalın kendi monomerini ekleme hız sabiti ile radikali diğer monomeri



ekleme hız sabitlerinin oranı olan reaktif oranı r_1 birden büyük bir değere sahip olduğu bulunmuştur.

Polimerin kararlılığını test etmek için, -1.0 V ve 1.2 V arasında 500 mV / sn 'lik bir tarama hızı ile defalarca potansiyel uygulanarak ilk ve 500. döngüler arasında akımda ve yük değerinde herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Bu da P(HKCN)'nin mükemmel çevresel ve redoks stabilitesine sahip olduğunu göstermiştir.

HKCN monomeri çalışmanın ikinci kısmında biyosensör uygulamalarında kullanılmıştır. Bu amaçla, yüzeyleri HKCN ile modifiye edilmiş grafit elektrotları temel alan mikrobiyal biyosensörler hazırlanmıştır. *G. oxydans* hücreleri, elektrot yüzeyinde elektrokimyasal polimerizasyonu gerçekleştirilmiş olan HKCN monomerine glutaraldehid vasıtasıyla kovalent bağlar oluşturularak immobilize edilmiştir. Karbohidrat tayini amacıyla hazırlanan biyosensörlerin ilk olarak çalışma koşulları (pH, monomerin elektrokimyasal polimerizasyon süresi, hücre sayısı) optimize edilmiştir. Daha sonra doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. Biyosensöre ait diğer karakterizasyon çalışmalarına (tekrarlanabilirlik, operasyonelstabilite, substrat spesifikliği, girişim etkisi ve örnek uygulamla) proses kontrolünün kolaylığı ve yüksek tekrarlanabilirlikte ölçümler alınabilmesi nedeniyle Akışa Enjeksiyonlu Analiz-FIA sistemi ile devam edilmiştir.

Bu sistemi diğer glukoz biyosensörlerinden farklı kılan stabiliteyi, hızı ve duyarlılığı arttıran iletken polimerlerin kullanılmasıdır. Aynı zamanda mikrobiyal biyosensörlerin de kattığı bazı avantajlar vardır. Geliştirilen biyosensörlerin büyük bir kısmı enzim katalizli ya da mikrobiyal katalizli reaksiyonları temel almaktadır. Enzim sensörleri ilgili substratlarına karşı yüksek spesifiklik gösterir, ancak enzimler genelde pahalıdır ve stabil değildir. Mikrobiyal biyosensörler ise ekonomik olmaları, saflaştırma işlemlerine gerek duyulmaması, koenzim kullanımı gerektirmemeleri ve kararlı olmaları nedeniyle biyosensörlerde önemli kullanıma sahiptirler. Biyomoleküller için uygun bir matriks olan ve bu nedenle biyosensör uygulamalarında stabiliteyi, hızı ve duyarlılığı artırmak amacıyla kullanılabilen iletken polimerler aracılığıyla hazırlanan mikrobiyal biyosensörün doğrusal tayin aralığının geniş olması, operasyonel kararlılığının iyi olması ve sensör sistemi ile tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmesi geliştirilen biyosensörün biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanına sahip olabileceğini göstermektedir.

Substrat spesifikliği denemesinde diğer bileşiklere de cevap alınmıştır. *Gluconobacter* hücreleri çoklu dehidrogenaz aktivitesine sahiptirler ve bu yüzden substrat aralıkları geniştir. Ancak *G. oxydans* ile hazırlanan biyosensörlerin spesifikliği hücrelerin dehidrogenaz aktiviteleri kontrol edilerek değiştirilebilir.



Ticari örneklerde glukoz tayini yapıldı ve referans metod ile tutarlı sonuçlar elde edildi.

Sonuç olarak, batch(kesikli) ve FIA sistemi ile entegre edilerek hazırlanan mikrobiyal biyosensör, etkin, stabil çalışan ve doğal örnekler için uygulama potansiyeli yüksek olan bir sistem olması ile diğer elektrokimyasal sistemlere alternatif oluşturmaktadır.

[FcP(=S)(μ -S)]₂ ile 4-(1-H-Pirol-1-yl)fenol'un toluen içindeki reaksiyonu ile TP-Fc sentezlenmiştir. Sentezlenen madde ¹H-NMR ve FTIR ile karakterize edilmiştir. TP-Fc polimerleşmesi için, farklı çözücü sistemleri kullanılmıştır. TP-Fc' nin TBP₆/DCM ve TBP₆/ACN çözücü sistemleri içerisinde dönüşümlü voltametrileri alınmıştır.

Sentezlenen TP-Fc ile Pirol (Py) farklı çözücüler (DCM, ACN) içinde TBP₆ destek elektroliti kullanılarak kopolimerleştirilmiş ve dönüşümlü voltametrileri alınmıştır. Dönüşümlü voltametri grafiklerinin şekil ve potansiyel değerleri farklılığından TP-Fc monomeri ile pirolün P(TPFc-co-Py) oluşturmak üzere kopolimerleştiğini göstermektedir.

TP-Fc maddesinin spektroeletrokimyasal özelliklerini incelemek amacıyla P(TPFc-co-Py)'nin farklı çözücülerde UV spektrumları alınmış ve P(Py) ile karşılaştırılmıştır.

TP-Fc için çalışmanın ikinci kısmında glukoz/GOx enzimini içeren medyatörlü enzim biyosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, TP-Fc ve TPA monomerleri grafit elektrot üzerinde kopolimerleştirilmiştir. Hazırlanan TPFc-co-TPA/GOx enzim biyosensörlerinin performansını etkileyen önemli parametrelerin optimizasyonu sonrasında analitik karakterizasyonu yapılmıştır.

TPFc-co-TPA/GOx enzim elektrodunun Lineweaver-Burk eğrisi çizilmiş ve $-1/K_m$ değeri 66.108 bulunmuştur. Optimize edilmiş çalışma koşullarında hazırlanan TPFc-co-TPA/GOx biyosensörü için analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği incelenmiş ve 12 ölçüm için standart sapma (S.S) $\pm 0,445$ mM (n=12) ve varyasyon katsayısı (cv) % 4,84 (n:12) olarak hesaplanmıştır.

TPFc-co-TPBA/GOx biyosensörüyle ticari örneklerde analiz yapılmış spektrofotometrik yöntem kullanılarak doğruluk kontrol edilmiştir. Biyosensör cevapları gerçek sonuçlar ile tutarlılık göstermiştir.

3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin % 76 verimle 3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin %69 verimle sentezlenmiştir. Bu iki malzemeye amin grubunun farklı pozisyona bağlanmasının elektrokimyasal ve biyosensör uygulamalarını araştırmak amacıyla ilk olarak dönüşümlü voltametri uygulanmış ve CV grafiklerinde farklar gözlemlenmiştir. Her iki



maddenin de farklı tarama hızlarında CV grafikleri çizilmiş ve tarama hızı arttıkça polimerleşmenin arttığı gözlenmiştir.

Her iki maddenin de monomersiz TBAPF₆ /DCM çözücü sisteminde farklı potansiyelerde UV-spektrumları alınmış, π - π^* geçişlerine ait maksimum dalga boyları (λ_{max}) RF için 430 RMF için 502 olarak ölçülmüştür. Her karışımdaki renk değişimleri kaydedilmiştir. Amin grubunun benzen halkasına para konumundan bağlı olduğu RF de multielektrokromik özellik görülmüştür. Amin grubunun benzen halkasına meta konumundan bağlı olduğu RMF de ise indirgen halde sarı yükseltgen halde mavi olmak üzere 2 farklı renk görülmüştür. Bu da elektrokromizm için bağlanma şeklinin önemli olduğunu gösteren bir sonuçtur.

Bu çalışma için ikinci olarak biyosensör uygulamaları incelenmiştir. İki maddede glukoz biyosensörü olarak hazırlanmış koşullar optimize edilmiştir. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları 0,05-1,0 mM glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusallık göstermiştir. RF RMF Glukozoksidaz biyosensörünün belirli glukoz konsantrasyonlarında çalışma tamponu ve çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirliği incelenmiş, değerleri saptanmıştır. Bu işlemler sonrasında glukozoksidaz biyosensörü ile glukoz standardı için standart sapması RF örneği için (S.D) ± 0.153 mM (n=10) RMF (S.D) ± 0.142 mM (n=10) örneği için olarak bulunmuştur.

RF biyosensör cevabı daha iyi sonuç getirdiği için örnek uygulama testleri RF'ye yapılmıştır. Hazırlanan RF glukozoksidaz biyosensörünün ticari örneklerde glukoz analizine yönelik uygulanabilirliğini izlemek amacıyla kola ve gazoz örnekleri kullanılmıştır. Referans yöntem olarak spektrofotometrik bir yöntem ile örneklerdeki glukoz miktarı belirlendikten sonra sonuçlar birbiri ile kıyaslanmış ve tutarlı sonuçlar elde edilmiştir.

Literatürde benzer türevi bulunmayan ferrosenilditiyofosfanat içeren monomer RF-Fc sentezlenmiş, ¹H-NMR spektrumu ile karakterize edilmiştir. RF-Fc, ferrosen ve RF ile CV grafikleri üzerinden karşılaştırılmış ve farklı indirgenme yükseltgenme piklerine sahip oldukları gözlenmiştir.

RF-Fc iyi iletken özellik gösteren EDOT ile belli oranlarda karıştırılarak hazırlanan çözeltilerinin dönüşümlü voltametriyi incelenmiştir. RF-Fc ve EDOT' a ait CV grafiklerinin şekilsel ve potansiyel değerleri bakımından hem kendi aralarında hem de karışımların CV grafiklerinden çok farklı özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuç RF-Fc ve EDOT'un farklı oranlarda karıştırılarak hazırlanan çözeltilerinin kopolimer oluşturduğunu göstermektedir.

P(RF-Fc), P(RF-Fc-co-EDOT) un sabit potansiyelde filmleri hazırlanarak farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametriyi alınmıştır. Alınan akım değerlerinin tarama hızlarıyla



doğru orantılı olması polimer filmlerin elektroaktif olduğunu ve elektroda iyi bağlandığını göstermektedir. Tarama hızına karşı çizilen akım grafiğindeki doğrusallık elektrokimyasal sürecin difüzyonun kontrollü olmadığını ve tersinir bir reaksiyon olduğu göstermektedir.

Kopolimer kompozisyonunun monomer reaktivite oranıyla doğru tahmin edilmesi, kopolimerlerin gerekli fiziksel kimyasal özellikleri ile belirli uygulamalarının değerlendirilmesi için oldukça önemlidir. Bu amaçla P(RF-Fc-co-EDOT) için karışım oranları ve spektrumları karşılaştırılarak kopolimer reaktive oranı belirlenmiş ve kopolimer bileşimi aydınlatılmıştır.

P(RF-Fc-co-EDOT) için farklı oranlardaki karışımlardaki çalışma elektrodu sabit potansiyellerde kaplanmış renk değişimleri kaydedilmiştir. ($\pi-\pi^*$) geçişleri ve E_g hesaplanmıştır. Kopolimer içerisindeki EDOT miktarı arttıkça elde edilen kopolimerlerin band boşluğu enerjisinin düştüğünü, $\pi-\pi^*$ geçişlerine ait maksimum dalgaboylarının ise artarak PEDOT'un maksimum dalgaboyuna yaklaştığını ve bu özelliklere bağlı olarak da kopolimerlerin multielektrokromik özellik gösterdikleri saptanmıştır.

Elektrokimyasal kopolimerleştirme işleminde monomer besleme oranları yanında uygulanan polimerleştirme potansiyelin kopolimer bileşimine ve özelliklerine etkisini incelemek amacıyla sabit monomer bileşimine sahip çözeltilere farklı potansiyeller uygulanarak kopolimerler sentezlenmiştir. Sabit derişime sahip bu çözeltilerin artan polimerleştirme potansiyeliyle sentezlenen kopolimerlerin optik özellikleri saptanmıştır. Farklı potansiyeller uygulanarak elde edilen kopolimerlerin özellikle $\pi-\pi^*$ geçişlerine ait maksimum dalgaboyları ve band boşluğu enerjileri (E_g) hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda uygulanan polimerleşme potansiyelinin kopolimer bileşimine etkisi olduğu ve artan potansiyel ile kopolimer yapısına daha fazla EDOT girdiği saptanmıştır. Ayrıca artan potansiyel ile band boşluğu enerjisinin düştüğü görülmüştür. Bu sonuç düşük band boşluğuna sahip EDOT'un artan potansiyelle kopolimer bileşiminde daha fazla bulunduğu diğer bir göstergesidir.

Dalga boyundaki geçirgenlik değişimi ile polimerin redoks bölgeleri arasındaki tepkime zamanı spektroeletrokimyasal olarak belirlenmiştir. P(RF-Fc) nin ve P(RF-Fc-co-EDOT) un tepki zamanları kronoamperometrik çift potansiyel yöntemi ile ölçülmüştür. P(RF-Fc) için 800 nm de tepki zamanı 2,5s 430 nm için 1,5s olarak P(RF-Fc-co-EDOT) için 1000 nm'de 2,2s 550 nm için 1.98 s olarak ölçülmüştür.

Sentezlenen P(RF-Fc) maddesinin ferrosen içermesi biyosensör için iletici sistem olabilir düşüncesini doğurmuş ve çalışmanın ikinci kısmında maddenin biyosensör özellikleri incelenmiştir. Ditiyofosfanat içeren maddenin (RF-Fc) ferrosen gibi katalitik redoks özelliği gösteren bir medyatör içeriyor olması biyosensör uygulaması için avantaj teşkil etmiş olsada, biyoreseptörün elektrot yüzeyine kovalent immobilizasyonu için primer amin ($-NH_2$)



fonksiyonelliğine sahip grup içermiyor olması dezavantaj oluşturmuştur. Fonksiyonel primer amin grubuna sahip olan RF maddesi ile RF-Fc maddesi grafit elektrot yüzeyinde kopolimerleştirilerek dezavantaj ortadan kaldırılmıştır. Kopolimere glukoz oksidaz enzimi immobilize edilerek polimerin glukoz sensöründe çevirici eleman olarak uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Glukozoksidaz enzimi kullanılarak glikoz biyosensörü tasarlanmış ve kopolimer kompozisyonu ve pH optimizasyonu yapılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Tasarlanan biyosensör ile gerçek örnekler üzerinde (ticari kola ve gazoz) glikoz tayini yapılmış ve referans metod ile tutarlı sonuçlar elde edilmiştir.



Kaynakça

- Ak, M., C. Tanyeli, M.I. Akhmedov, ve L. Toppare. *Thin Solid Films*, 2008: 4334-4341.
- Beleze, A., J. Fabio and Zarbin, ve G. Aldo. *Chem. Soc*, 2001: 542.
- Burroughes, H.J., et al. *Nature* 347, 1990: 539.
- Cravino, A., ve S.N Sariciftci. *J. Mater. Chem*, 2002: 1931.
- Dinçkaya, E. «Enzim Sensörleri.» *Biyosensörler*, 1999: 81-142.
- Dzyadevych, S.V., V.N. Arkhypova, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet, ve N. Jaffrezic-Renault. *ITBM-RBM*, 2008: 171-180.
- Gerard, M., A. Chaubey, ve B.D. Malhotra. «Application of conducting polymers to biosensor.» *Biosensors and Bioelectronics* 345-359.
- Horovitz, G. *Adv. Mater*, 1998: 365.
- Karube, I., ve K. Nakanishi. *IEEE Eng. Med. Biol.*, 1994: 364-374.
- Kickelbick, G. *Progress in Polymer Science*, 2003: 83.
- Liang, Sua, Jia Wenzhao, Houb Changjun, ve Leia Yu. «Microbial Biosensors: A review.» *Biosensor and Bioelectronics*, 2011: 1788-1799.
- Malhotra, B.D., A. Chaubey, ve S.P. Sings. «Prospects of conducting polymers in biosensors.» *Analytica Chimica*, 2006: 59-74.
- Mohanty, Saraju P., ve Elias Kougiianos. *IEEE Potential Biosensors*, 2006.
- Sharma, S.K., R. Singhal, B.D. Malhotra, N. Sehgal, ve A. Kumar. *Biosens. Bioelectron.*, 2004: 651-657.
- Sheetal, Paliwal. «Development of enzyme-based biosensor for the detection of organophosphate.» 2008.
- Sommani, P.R., ve S. Radhakrishnan. *Mater. Chem. Phys*, 2002: 117.
- Tkac, J., V. Stefuca, P. Gemenier, V. Nedoviç, ve R. Willaert. *Springer*, 2005.
- Turkaslan, O., M. Ak, C. Tanyeli, M.I. Akhmedov, ve L. Toppare. *J. Polym. Sci*, 2007.
- Varis, S., M. Ak, C. Tanyeli, ve L. Toppare. *L.*, 2007: 8-14.
- Velasco-Garcia, M.N., ve T. Mottram. *Biosyst. Eng.*, 2003: 1-12.
- Vidal, C.J, G.E Ruiz, ve R.J Castillo. *Microchim. Acta*, 2003: 143,93.
- Vidal, J.C., E.G. Ruiz, ve J.R. Castillo. «Recent Advances in Electropolymerized Conducting Polymers in Amperometric Biosensors.» *Microchim Acta* , 2003: 93-111.





Enzyme immobilization in a photosensitive conducting polymer bearing azobenzene in the main chain

Journal:	<i>Polymer Bulletin</i>
Manuscript ID:	PB-12-0694
Manuscript Type:	Polymer Engineering
Date Submitted by the Author:	09-Dec-2012
Complete List of Authors:	Ak, Metin; Pamukkale University, Chemistry Yildiz, Huseyin; Karamanoglu Mehmet Bey, Chemistry Toppare, Levent; Middle East Technical Univ., Chemistry
Keywords:	conducting polymers, photosensitive, enzyme immobilization

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

Enzyme immobilization in a photosensitive conducting polymer bearing azobenzene in the main chain

Metin Ak^{1*}, Hüseyin Bekir Yildiz², Levent Toppare^{3,4,5}

¹*Pamukkale University, Department of Chemistry, 20070, Denizli, Turkey*

²*Karamanoğlu Mehmetbey University, Department of Chemistry, 70100, Karaman, Turkey*

³*Middle East Technical University, Department of Chemistry, 06531 Ankara, Turkey*

⁴*Department of Biotechnology, Middle East Technical University, 06800 Ankara, Turkey*

⁵*Department of Polymer Science and Technology, Middle East Technical University, 06800 Ankara, Turkey*

Abstract

A new photosensitive and thermosensitive monomer; namely bis(4-(3-thienyl ethylene)-oxycarbonyl)diazobenzene (TDAZO), was synthesized. The photochemical and thermal cis-trans isomerization of the monomer has been investigated. The rate constants of the photoisomerization of TDAZO in ACN and DCM were 0.195 and 0.308 min⁻¹ respectively.

For spectroelectrochemical investigation and enzyme immobilization application, TDAZO copolymerized with thiophene and pyrrole. Electrochemical and spectroelectrochemical properties of P(TDAZO-co-Th) were investigated and invertase was immobilized in P(TDAZO-co-Py) copolymer. Immobilization of enzymes was carried out by the entrapment of the enzyme in conducting polymer matrices during electrochemical polymerization of pyrrole through thiophene moieties of the TDAZO. Optimum conditions for this electrode, such as pH, temperature, kinetic parameters (K_m and V_{max}) and operational stability were investigated. Kinetic parameters invertase immobilized in copolymer were smaller than free enzyme. The optimum operational temperature was 10°C higher for immobilized enzyme than that of the free enzyme. Due to strong interaction between enzyme and diazo group in the polymer main chain, thermal, pH and operational stability of enzyme has been enhanced.

Keywords: conducting polymer, photosensitive azobenzene, enzyme immobilization, invertase

* *Corresponding author. Tel: +90-258-2963595; fax: +90-258-2963535*

E-mail address: metinak@pau.edu.tr

1. Introduction

A responsive macromolecule is one that changes its conformation and/or properties in a controllable, reproducible, and reversible manner in response to an external stimulus (e.g. photo, solvent, pH, or temperature). These changes in conformation/physicochemical properties of the stimuli-responsive materials can be utilized to create a large variety of smart devices, such as sensors, actuators and control release systems, for various practical applications. The good processability of most stimuli-responsive materials facilitates their incorporation into devices and adds additional advantages for the development of smart devices with novel features (e.g. all plastic electronic/optical sensors) [1].

Azobenzene containing polymers are widely employed in a variety of research fields. The rigid rod like azobenzene groups can be used to provide the mesogenic units and a number of liquid crystalline (LC) polymers with azobenzene units have been reported [2-6] One of the most special properties of the azobenzene group originates from trans-cis photoisomerization. The trans form is generally thermodynamically more stable than the cis form. The stable trans form can be photoisomerized to the cis form when excited by light. Cis-to-trans isomerisation can occur either photochemically or thermally. Since the trans state is more stable, the cis state thermally isomerizes back to the trans form even in the dark. The time scale of this thermally isomerisation occurs on time scale of milliseconds to several days depending on the substituents of the azobenzenes and the environment [7].

The azobenzene chromophores have also been extensively used in designing nonlinear optical (NLO) polymers over the past decade. In systems are receiving increasing attention due to their special properties and their potential applications [8-9].

Since the discovery of the high electrical conductivity of π -conjugated polymers, they have been also attracting growing interest due to their broad range of applications, including sensors, batteries and capacitors, organic light-emitting diodes (OLEDs), optical displays, catalytic electrodes, actuators and anticorrosion coatings. Conjugated polymers are also good candidates for photonic materials due to their strong delocalization of electrons contributing to the large and

1
2
3 fast optical response [10]. Polythiophenes are well known for their relatively easy
4 functionalization among other conjugated polymers and having relatively little impact on
5 electronic properties as the substituent was attached through β carbons. Moreover, the presence
6 of substituents can modify physical and electronic properties of resulting polymers [11-15].
7
8
9

10
11 The combination of polythiophene with photoactive azobenzene could provide a new approach to
12 develop other novel materials with unique electronic and optical properties. These polymeric
13 systems can also be interesting for enzyme entrapment applications. Enzymes are biological
14 catalysts that increase the rate of chemical reactions taking place within living cells by lowering
15 the energy of activation, without themselves appearing in the reaction products. Unlike most
16 inorganic catalysts, enzymes are generally soluble and unstable; thus, these organics can be used
17 only once in solutions. Enzymes may be used in industry in free or immobilized forms [16].
18
19
20
21
22
23
24

25
26 Immobilization of enzymes makes heterogeneous catalysis possible, which has great advantages:
27 it is possible to use a single batch of enzymes repetitively and to stop the reaction by physical
28 removal of the immobilized enzyme from the solution. Also, in many cases, the enzyme is
29 stabilized by bonding. Additional advantages include easy analyte determination in complex
30 mixtures and use of small sample volumes. The enzyme will still be active and largely
31 uncontaminated, hence can be used again. Also, longer life, predictable decay rate and
32 elimination of reagent preparation are further advantages of immobilization [17]. Invertase,
33 known as α -fructofuranosidase (E.C.3.2.1.26), catalyzes the hydrolytic breakdown of sucrose to
34 glucose and fructose. The mixture of these products has a lower crystallinity than sucrose at high
35 concentrations. The use of invertase hence ensures that the products remain fresh and soft even
36 when kept for a long time. Therefore, it is widely used in the production of artificial honey and to
37 a small extent in the industrial production of liquid sugar [18]. The immobilized form of invertase
38 has so far only been employed experimentally, since the soluble enzyme is available at little cost;
39 however, the use of invertase in the entrapment process sheds light on the immobilization of
40 expensive enzymes in conducting polymer matrices.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 In literature there are quite a number of papers on conducting polymers bearing diazo group in
53 side chain. However, there is little research on such a diazo group in the main chain [19]. In this
54 paper the polymer that contains photosensitive diazo group in the main chain was synthesized
55
56
57
58
59
60

1
2
3 and its enzyme immobilization application and spectroelectrochemical properties were
4 investigated.
5
6
7
8
9

10 **2. Experimental**

11 **2.1. Materials**

12
13
14
15 Invertase, β -fructofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased
16 from Sigma. Pyrrole (Merck) was distilled before use and stored at 4 °C. Sodium hydroxide, 4-
17 nitrobenzoic acid, glucose, acetic acid, thionyl chloride, triethylamine, n-hexane, 3-thiophene
18 ethanol were purchased from Aldrich and used without further purification. For the preparation of
19 the Nelson Reagent, sodium carbonate (Riedel de Haen), sodium potassium tartarate (Riedel de
20 Haen), sodium bicarbonate (Merck), and sodium sulfate (Merck), and for the preparation of the
21 arsenomolybdate reagent; ammonium heptamolybdate (Merck) and sodium arsenate (Merck)
22 were used as received.
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 **2.2. Instrumentation**

33 Three-electrode cell geometry was used in all electrochemical experiments. ITO (indium tin
34 oxide) coated glass rectangular (0.9 cm x/2.7 cm) slide was used as the working electrode. Pt and
35 Ag wires were used as the counter and reference electrodes respectively. All potential values are
36 referred to Ag/Ag⁺ reference electrode. An Ivium potentiostat/galvanostat interfaced with a
37 personal computer was used in all electrochemical measurements. In situ UV-vis
38 spectroelectrochemical measurements were carried out in three-electrode quartz cell. The
39 working electrode was an ITO glass slide; Ag and Pt wires were used as the reference and
40 auxiliary electrodes, respectively. The spectra were recorded with a Diode Array UV-vis
41 spectrophotometer (Agilent 8453), interfaced with a PC. The structure of the monomer was
42 confirmed by NMR and IR spectral analysis. Thermoresponsive properties of the TDAZO were
43 investigated by Agilent 8453 Diode Array UV-vis spectrophotometer equipped with peltier
44 temperature control accessory. ¹H-NMR spectra of the monomer were taken by using a Bruker-
45 instrument NMR spectrometer (DPX-400) with CDCl₃ as the solvent and tetramethylsilane as the
46 internal standard. Nicolet 510 FTIR Spectrophotometer was used for FTIR studies.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2.3. Synthesis of Monomer

4,4'-Azodibenzoyl chloride was prepared according to a typical procedure that was shown in Scheme 1. 4-Nitrobenzoic acid was reacted with glucose in the presence of sodium hydroxide at 50 °C and 4,4'-azodibenzoic acid was obtained in quantitative yield. Then 4,4'-azodibenzoic acid was converted to 4,4'-azodibenzoyl chloride by reaction with thionyl chloride. Monomer was synthesized by condensation of this diacid chloride with 3-thiophene ethanol.

2.3.1. 4,4'-Azodibenzoyl chloride

4,4'-Azodibenzoic acid was synthesized in quantitative yield according to literature [20].

Melting-decomposition point >300 °C; FT-IR (KBr): 3600–3000 (m, br), 1691 (s), 1600 (s), 1579 (s), 1426 (s), 1300–1200 (s, br), 868 (s), 773 (s) cm⁻¹.

4,4'-Azodibenzoic acid (2 g, 7.4 mmol) was placed into a 50 mL round-bottomed flask containing 8 mL of thionyl chloride and 0.1 mL triethylamine. The mixture was heated on an oil bath up to 60 °C, until the suspension mixture was converted to a clear solution. Then, the solution was stirred for overnight at room temperature. Unreacted thionyl chloride was removed under reduced pressure and the residue was washed twice with dry n-hexane to obtain 2.1 g (93%) of red crystals of 4,4'-Azodibenzoyl chloride; mp 177–179 °C, FT-IR (KBr): 1776 (s), 1732 (m, br), 1595 (m), 1408 (m), 1195 (s, br), 885 (s), 804 (m), 646 (m) cm⁻¹.

2.3.2. Bis(4-(3-thienyl ethylene)-oxycarbonyl) diazobenzene

To a mixture of 2.40 g (21 mmol) 3-thiophene ethanol and 2.02 g (20 mmol) dry triethyl amine (TEA) in a two necked round bottom flask equipped with a reflux condenser and a dropping funnel, 3.07 g (10 mmol) of 4,4'-Azodibenzoyl chloride dissolved in 100 mL of dry chloroform was added drop wise while stirring. The reaction was kept at reflux for 3 days with continuous stirring. Then, the reaction mixture was washed with 1% HCl solution and distilled water (each one for four times) and dried over CaCl₂. The solvent was evaporated out with a rotary evaporator and the residue was extracted with hot methanol to remove unreacted traces of 3-thiophene ethanol and 4,4'-Azodibenzoyl chloride. The crude product was purified by

1
2
3 reprecipitation three times from THF solution to hexane and an orange colored solid was
4 obtained. After filtration, pure TDAZO was dried in vacuum oven.
5
6
7
8

9 <<Scheme 1>>
10
11
12
13

14 **2.4. Photoresponsive and thermoresponsive properties of TDAZO**

15 The photoisomerization behavior of the TDAZO in ACN, DCM and chloroform solutions was
16 investigated by UV-vis spectroscopy after irradiation with 360 nm UV light. While irradiation at
17 360 nm, the absorption changes were recorded with a UV spectrometer. The peak at 230 nm,
18 corresponding to the $n-\pi^*$ transition (cis state) increased, while that at 328 nm corresponding to
19 the $\pi-\pi^*$ transition (trans state) decreased with irradiation time in acetonitrile. The peaks in
20 chloroform were 250 nm for cis state and 332 nm for the trans state.
21
22

23 Optical changes of materials can also be induced through conformational changes caused by
24 temperature changes. Thermoresponsive properties of the TDAZO was investigated with a peltier
25 temperature control accessory equipped Diode Array UV-vis spectrophotometer.
26
27
28
29
30
31
32

33 **2.5. Spectroelectrochemistry**

34 Spectroelectrochemical studies were carried on a Agilent 8453 UV-vis spectrophotometer. To
35 carry out spectroelectrochemical and electrochromic studies, copolymer films were synthesized
36 on ITO-coated glass. Copolymer films deposited on ITO-coated glass were used both for
37 spectroelectrochemistry and electrochromic measurements in TBAFB (0.1 M)/AN with Ag/Ag^+
38 as the reference electrode and a Pt wire as the auxiliary electrode.
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **2.6 Synthesis of Poly(TDAZO-co-Py)**

49 Pyrrole was polymerized electrochemically on platinum (Pt) electrode that was previously coated
50 with TDAZO (1% w/v in DCM). SDS was used as the supporting electrolyte in water, and
51 electropolymerization yielded a black film on the electrode after 30 min by applying 1.0 V
52 against the Ag/Ag^+ reference electrode.
53
54
55
56
57
58
59
60

2.7. Immobilization of invertase in Poly(TDAZO-co-Py)

Electropolymerization was performed in a three compartment cell. This cell contains Pt foils as the working and counter electrodes with a Ag/Ag⁺ (0.001 M) reference electrode. Electrolysis solution consists of 10 mL acetate buffer (50 mM pH = 5.0) 0.6 mg/mL invertase, 0.6mg/mL SDS, and 40 μ L pyrrole. The working electrode was coated with TDAZO from its dichloromethane solution. Electrolyses were done at 1.0V constant potential for 30 min.

2.8. Determination of enzyme activity

For immobilized invertase, different concentrations of sucrose in buffer solution (acetate buffer pH = 5.0) were placed in test tubes and put in a water bath at 25°C for 10 min. After reincubation, enzyme electrodes were immersed in test tubes and shaken in the water bath for 2-6 min. Aliquots (1.0 mL) of these solutions were withdrawn, and 1.0 mL Nelson's Reagent was added. The tubes were then placed in boiling water for 20 min. Samples were cooled in an ice-bath, and 1.0 mL of arsenomolybdate solution was added to the tubes and mixed by vortexing. Finally, 7.0 mL of distilled water was added to each of the test tubes. After mixing, absorbance was measured at 540 nm using a Agilent 8453 model UV–vis spectrophotometer.

2.9. Determination of optimum pH and optimum temperature

The reaction temperature was changed between 10°C and 80°C while sucrose concentration was kept constant at about 10 K_m for each system. For pH optimization at 25°C, the pH of the reaction medium was changed between pH 2 and 9 while sucrose concentration was kept constant at about 10 K_m for each system. The activities were determined as previously described.

3. Results and discussion

3.1. NMR and FTIR spectra

¹H-NMR spectrum of the monomer evidences resonance signals of thiophene (Th), Th-CH₂ and benzene protons of relative intensities corresponding to the number and type of protons (Fig 1).

¹H NMR (δ , ppm) data for HMTA: 7.4–6.9 ppm (m 6H), 5.6 (br, 2H), 3.7 ppm (s 4H), 3.22 ppm (m 4H), 1.54 (m 4H), 1.25 ppm (m 4H).

<<Fig.1>>

The FTIR spectral characteristics of the copolymer P(TDAZO-*co*-Py) were discussed together with that of the monomer. TDAZO showed a characteristic, intense peak at 1711 cm⁻¹, which belongs to C=O stretching vibrations. Two peaks at 2948 cm⁻¹ and 2867 cm⁻¹ correspond to aliphatic methylene stretchings. The peak at 1251 cm⁻¹ indicates C-O-C ester group vibrations while the peak at 740 cm⁻¹ is the result from aromatic C-H_α stretching in thiophene units. FTIR spectrum of P(TDAZO-*co*-Py) showed intense peaks at 1044, 1121 and 1127 cm⁻¹ which belongs to dopant ions. Two peaks at 2924 cm⁻¹ and 2854 cm⁻¹ correspond to aliphatic methylene stretching. A characteristic peak 1690 cm⁻¹ belonging to carbonyl group of TDAZO was also observed. These results prove copolymerization.

3.2 Cyclic Voltammetry

Redox behavior of TDAZO was investigated via cyclic voltammetry (CV). CVs of TDAZO in AN–TBAFB system implied that the precursor monomer is not electroactive since it lacks any redox peaks (Fig.2a). Upon addition of Th into the reaction medium, an increasing redox peak with increasing scan number was observed (Fig. 2c). The number of cycles observed up to a certain current value was different than that of pure thiophene (Fig. 2b).

<<Figure 2>>

3.3. Photoisomerization and thermoresponsive behavior TDAZO

Photoisomerizations of TDAZO in acetonitrile and chloroform were investigated. The absorption intensity of the *trans*-form of azobenzene at 328 nm decreases, while the intensity of the *cis*-form of azobenzene at 230 nm slightly increases with the irradiation time. This indicates the *trans*-to-*cis* photoisomerization of the azobenzene chromophores. The peak at 230 nm, corresponding to the n- π^* transition (*cis* state) increased, while that at 328 nm corresponding to the π - π^*

1
2
3 transition (trans state) decreased with irradiation time in acetonitrile (Fig.3a). The peaks in
4 chloroform were 250 nm for cis state and 332 nm for the trans state (Fig.3b).

5
6 The photoisomerization kinetics of TDAZO are presented in the inset figure in Fig.3a and Fig 3b.
7 It can be seen that $\ln[(A_0 - A_e)/(A_t - A_e)]$ is linearly dependent on time (where A_0 , A_t and A_e are the
8 absorbances at 328 nm at time 0, time t and the photostationary state, respectively), confirming
9 that the *trans-to-cis* photoisomerizations of TDAZO obey first-order kinetics. The slope of the
10 plots of $\ln[(A_0 - A_e)/(A_t - A_e)]$ against time gives the first-order rate constants (k_p) for the *trans-to-*
11 *cis* photoisomerization of TDAZO. The rate constants of the photoisomerization of TDAZO in
12 ACN and DCM were 0.195 and 0.308 min^{-1} respectively.
13
14
15
16
17
18
19

20 Figure 3c shows the temperature dependence of the optical absorbance of TDAZO in ACN. Cis-
21 trans izomerization caused by heating leads to an increase absorption at 230 nm while a decrease
22 absorption at 328 nm.
23
24
25
26
27
28
29

30 << Figure 3 >>
31
32
33

34 3.4. Spectroelectrochemistry of P(TDAZO-co-Th)

35
36 Spectroelectrochemistry experiments reveal key properties of conjugated polymers such as band
37 gap (E_g) and the intergap states that appear upon doping. The film was deposited on ITO via
38 potentiostatic electrochemical copolymerization of TDAZO (0.01 M) in the presence of TBAFB
39 and Th in AN at 1.8 V. spectroscopy in the monomer free electrolytic system by switching
40 between +0.4 V and +1.0 V (Fig. 4). The onset energy for the $\pi-\pi^*$ transition (electronic band
41 gap) was found to be 1.95 eV and λ_{max} was 439 nm. Appearance of the peak around 720 nm
42 could be attributed to the evolution of polaron band. Upon further oxidation, appearance of
43 another absorption was observed at longer wavelengths (~1000 nm) due to bipolaron charge
44 carriers. Also diazo group absorption in 328 nm can be seen clearly in spectrum.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

<<Figure 4>>

3.5. Kinetic parameters of immobilized enzyme

The maximum reaction rate, V_{\max} , and Michaelis-Menten constant, K_m were obtained from Lineweaver-Burk plot. Reaction rate decreased sharply since enzyme was entrapped in a matrix. Poly(TDAZO-co-Py) matrix shows a smaller K_m value than free invertase. A smaller K_m value than free enzyme indicates that this matrix provides a microenvironment that is more suitable than the one in the solution. Kinetic parameters for free and immobilized invertase were shown in Table 1.

<<Table 1>>

3.6. Effect of pH on enzyme activity

Due to the denaturation, effect of changes in pH on the enzyme structure becomes important. The maximum activity was obtained at pH 4.6 for the free enzyme [21]. The maximum pH was found to be 6.0 for the P(TDAZO-co-Py) (Fig. 5a). The optimum pH was shifted towards the alkaline side when compared with the free enzyme because of the presence of dopant ions in the matrix. The copolymer matrix gave the high stability at lower pHs, such as pH 3-5. Therefore, the copolymer matrix can be used reliably at low pH values for enzyme reactions.

3.7. Effect of temperature on enzyme activity

The effect of temperature between 10 and 80°C on enzyme activity was investigated, and illustrated in Figure 5b. The maximum temperature for the free enzyme was found to be 50°C [22]. Maximum enzyme activity for the matrices was at 40°C. Although the copolymer matrix at low temperatures showed higher stability, at high temperatures the enzyme activity for this matrix reduces rapidly.

3.8. Operational stability of the enzyme electrode

1
2
3 It is tried to estimate the stability of the electrodes in terms of repetitive uses. In 40 successive
4 measurements, we observed very small fluctuations for copolymer matrix. The results are shown
5 in Figure 5c. The enzyme activities were almost stable during 40 experiments performed at 25°C
6
7 in 1 day.
8
9

10
11 <<Figure 5>>
12
13

14 15 16 **4. Conclusion**

17 Bis(4-(3-thienylethylene)-oxycarbonyl) diazobenzene (TDAZO) was synthesized by means of the
18 reaction between 4,4'-azodibenzoyl chloride and 3-thiophene ethanol. Photoresponsive and
19 thermoresponsive properties of TDAZO were investigated. Conducting copolymer of TDAZO
20 with thiophene, P(TDAZO-*co*-Th), was synthesized electrochemically using TBAFB (0.1 M)/AN
21 with Ag/Ag⁺ as the reference electrode and a Pt wire as the auxiliary electrode and
22 spectroelectrochemical properties of P(TDAZO-*co*-Th) were investigated. Conducting copolymer
23 of TDAZO with pyrrole, P(TDAZO-*co*-Py), was synthesized using sodium dodecyl sulfate as the
24 supporting electrolyte via constant potential electrolyses and characterized via IR spectroscopy.
25 The immobilization of invertase was done via entrapment within P(TDAZO-*co*-Py). This study
26 shows that P(TDAZO-*co*-Py) electrodes can be used for the immobilization of invertase, based
27 on kinetic studies, temperature and pH optimization and stability studies. Due to strong
28 interaction between enzyme and diazo group in the polymer main chain, thermal, pH and
29 operational stability of enzyme has been enhanced.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- [1] Dai L (2004) *Intelligent Macromolecules for Smart Devices: From Materials Synthesis to Device Applications*, Springer, pp 81-85
- [2] Brecl M, Ambrožič G, Žigon M (2002) Aromatic side-chain liquid-crystalline polyurethanes with azobenzene mesogenic units. *Polym Bull* 48(2):151-158
- [3] Li MH, Auroy P, Keller P (2000) An azobenzene-containing side-on liquid crystal polymer. *Liq Cryst* 27(11):1497-1502
- [4] Alazaroaie S, Toader V, Carlescu I, Kazmierski K, Scutaru D, Hurduc N, Simionescu CI (2003) Liquid crystalline polymers 14. Synthesis and thermal behaviour of some polyethers containing azo-mesogens. *Eur Polym J* 39:1333-1339
- [5] Sasaki T, Ikeda T, Ichimura K (1993) Photoisomerization and thermal isomerization behavior of azobenzene derivatives in liquid-crystalline polymer matrixs. *Macromolecules*, 26(1):151-154
- [6] Goldmann D (1998) Liquid crystalline 1,3,5-triazines incorporating rod-like azobenzene subunits. *Liq Cryst* 25(6):711-719
- [7] Sekkat Z, Knoll W (2002) *Photoreactive Organic Thin Films*, first ed. Academic Press.
- [8] Tsutsumi N, Yoshizaki S, Sakai W, Kiyotsukuri T (1995) Nonlinear optical polymers. 1. Novel network polyurethane with azobenzene dye in the main frame. *Macromolecules* 28(19) 6437-6442
- [9] Rodríguez FJ, Sánchez C, Villacampa B, Alcalá R, Cases R, Millaruelo M, Oriol L (2004) Optical anisotropy and non-linear optical properties of azobenzene methacrylic polymers. *Polymer* 45(7):2341-2348
- [10] Skotheim TA, Reynolds JR (2007) *Handbook of Conducting Polymers, Volume II Conjugated Polymers Processing And Applications*, third ed. CRC Press Taylor & Francis Group.
- [11] Zhao X, Hu X, Yue CY, Xia X, Gan LH (2002) Synthesis, characterization and dual photochromic properties of azo-substituted polythiophene derivatives *Thin Solid Films* 417:95-100
- [12] Zagorska M, Kulszewicz-Bajer I, Pron A, Sukiennik J, Raimond P, Kajzar F, Attias AJ, Lapkowski M (1998) Preparation and Spectroscopic and Spectroelectrochemical Characterization of Copolymers of 3-Alkylthiophenes and Thiophene Functionalized with an Azo Chromophore *Macromolecules* 31:9146-9153
- [13] Leelerc M, Faid K (1997) Electrical and optical properties of Processable Polythiophene Derivatives: Structure-Property relationships. *Adv Mater* 9:1087-1094

- 1
2
3 [14] Muramatsu Y, Yamamoto T, Hasegawa M, Yasi T, Koinuma H (2001) Piezochromic
4 behaviour of regioregular poly(3-hexylthiophene-2,5-diyl) and poly(5,8-dihexadecyloxy
5 anthraquinone-1,4-diyl). *Polymer* 42:6673-6675
6
7
8 [15] Levesque I, Lecterc M (1997) Novel dual Photochromism in Polythiophene Derivatives.
9 *Macromolecules* 30:4347-4352
10
11 [16] Palmer T (1995) *Understanding Enzymes* Prentice-Hall:London.
12
13 [17] Yildiz HB, Kiralp S, Toppare L, Yagci Y (2005) Immobilization of tyrosinase in
14 poly(ethyleneoxide) electrodes and determination of phenolics in red wines. *React Funct Polym*
15 *63:155-161*
16
17 [18] Yildiz HB, Kiralp S, Toppare L, Yagci Y (2005) Immobilization of invertase in conducting
18 polypyrrole/PMMA-co-PMTM graft copolymers. *J Appl Polym Sci* 96:502-507
19
20 [19] Apaydin DH, Akpınar H, Sendur M, Toppare L (2012) Electrochromism in multichromic
21 conjugated polymers: Thiophene and azobenzene derivatives on the main chain. *J Electroanal*
22 *Chem* 665: 52-57
23
24 [20] Tomlinson ML (1946) The reduction of p-nitrobenzoic acid to hydrazo- and azo-benzene-4 :
25 4'-dicarboxylic acids by means of glucose. *J Chem Soc* 753
26
27 [21] Erginer R, Toppare L, Alkan S, Bakir U (2000) Immobilization of invertase in
28 functionalized copolymer matrices. *React Funct Polym* 45:227-233
29
30 [22] Kizilyar N, Akbulut U, Toppare L, Ozden MY, Yagci Y (1999) Immobilization of Invertase
31 in Conducting Polypyrrole/polytetrahydrofuran graft polymer matrices. *Synt. Met.* 104:45-50
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Figure, Scheme and Table Captions**
4

5
6 Scheme 1. Synthesis route of TDAZO
7

8
9 Figure 1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the TDAZO
10

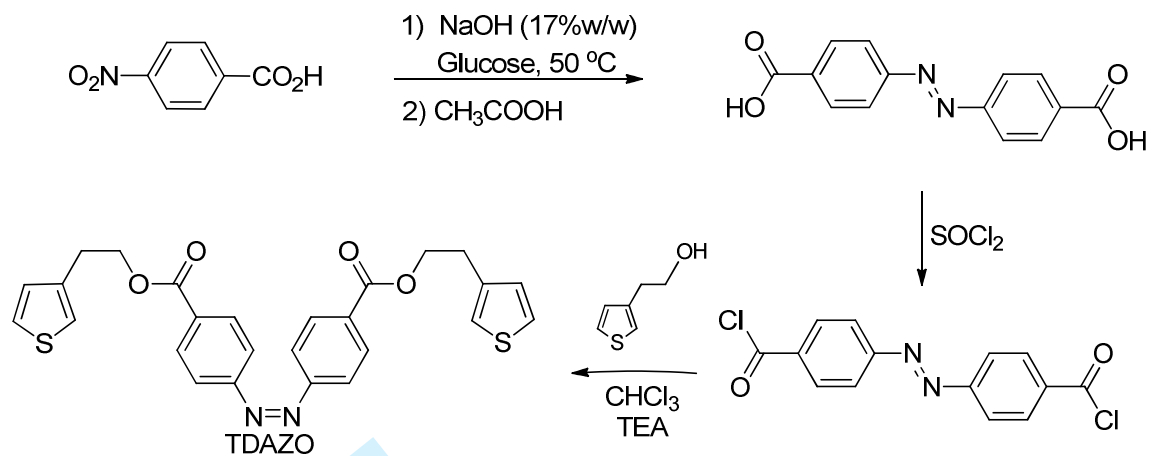
11
12 Figure 2. Cyclic voltammogram of (a) TDAZO, (b) polythiophene, (c) TDAZO in the presence of
13 thiophene in 0.1M TBAFB/AN.
14

15
16 Figure 3. Changes in the UV-vis absorption spectrum of TDAZO in a) ACN and b) DCM
17 solution at 25 °C with different irradiation times under 360 nm light irradiation. Inset figures are
18 first-order *trans-to-cis* isomerization kinetics of TDAZO c) Thermoresponsive behavior of the
19 TDAZO
20

21
22 Figure 4. Spectroelectrochemistry of the P(TDAZO-*co*-Th)
23

24
25 Figure 5 a) Effect of pH on invertase activity immobilized in P(TDAZO-*co*-Py) b) Effect of
26 incubation temperature on invertase activity in P(TDAZO-*co*-Py) c) Operational Stability of
27 P(TDAZO-*co*-Py)
28

29
30 Table 1. Kinetic parameters for free and immobilized invertase
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Scheme 1. Synthesis route of TDAZO

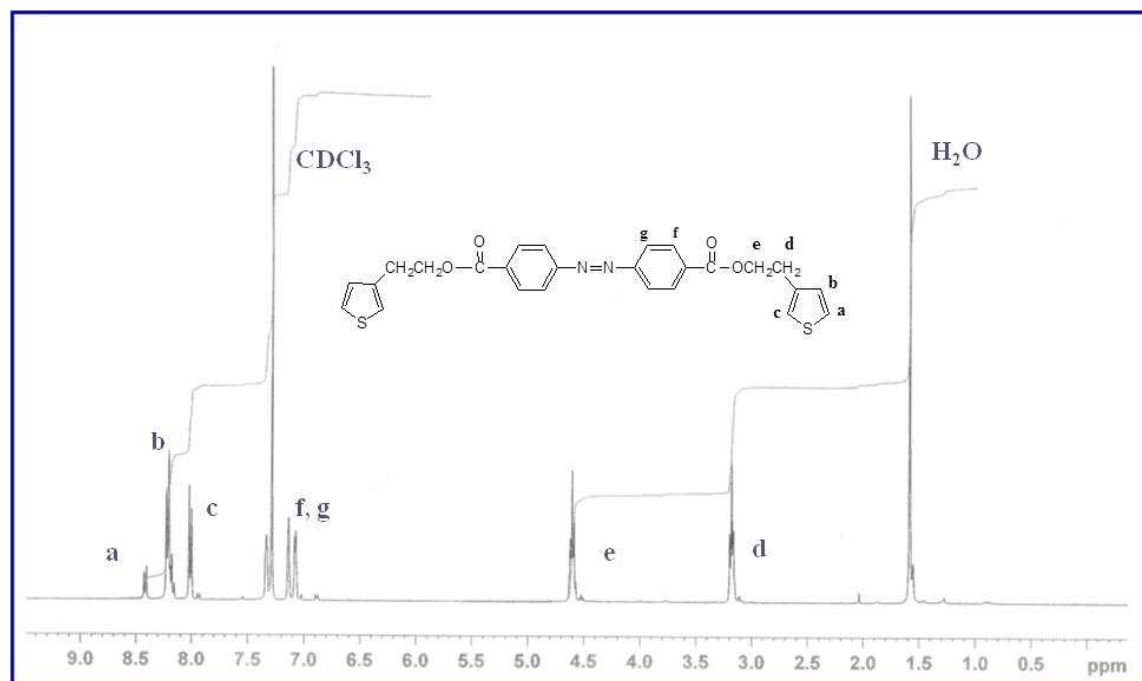


Figure 1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the TDAZO

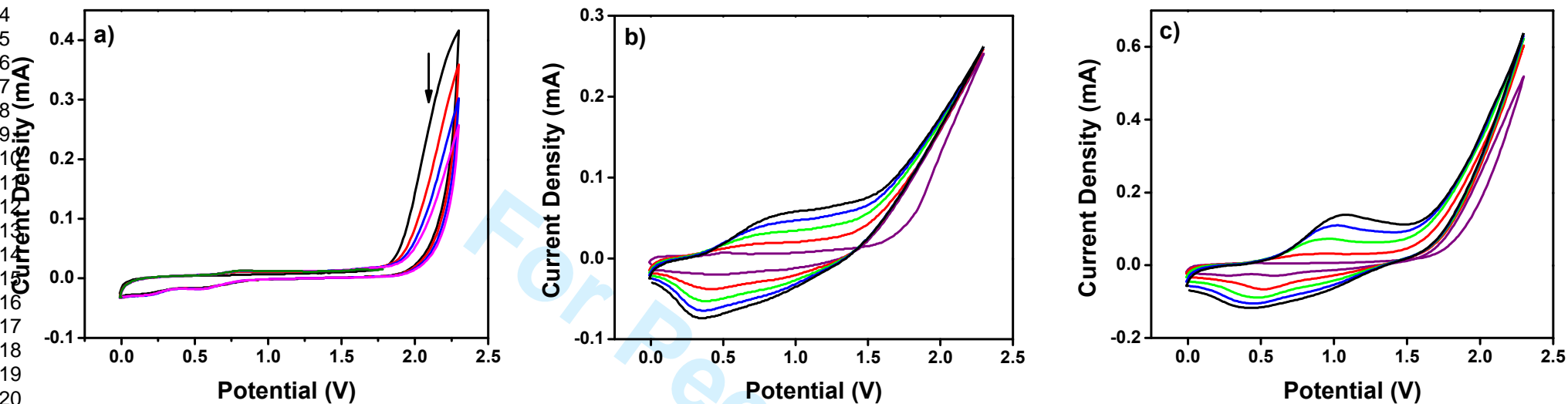
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Figure 2. Cyclic voltammogram of (a) TDAZO, (b) thiophene, (c) TDAZO in the presence of thiophene in 0.1M TBAFB/AN.

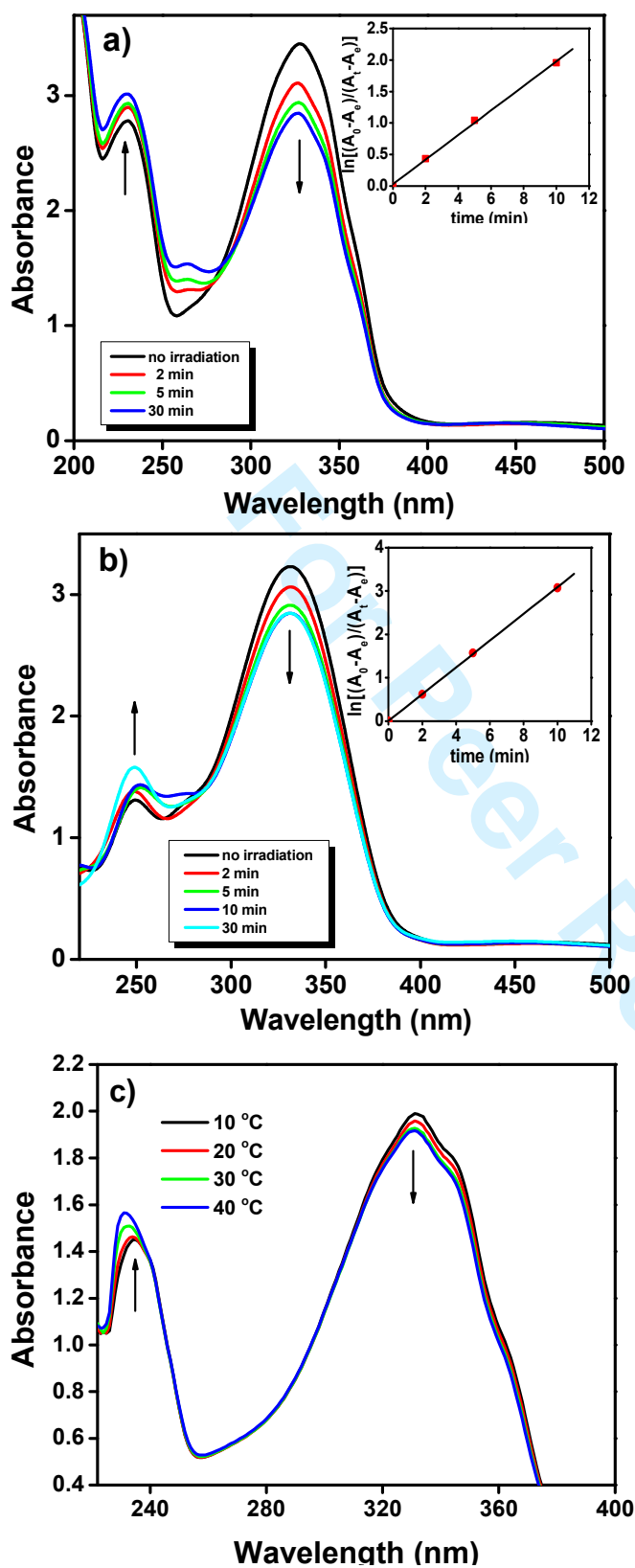


Figure 3. Changes in the UV-vis absorption spectrum of TDAZO in a) ACN and b) DCM solution at 25 °C with different irradiation times under 360 nm light irradiation. Inset figures are first-order *trans*-to-*cis* isomerization kinetics of TDAZO c) Thermoresponsive behavior of the TDAZO

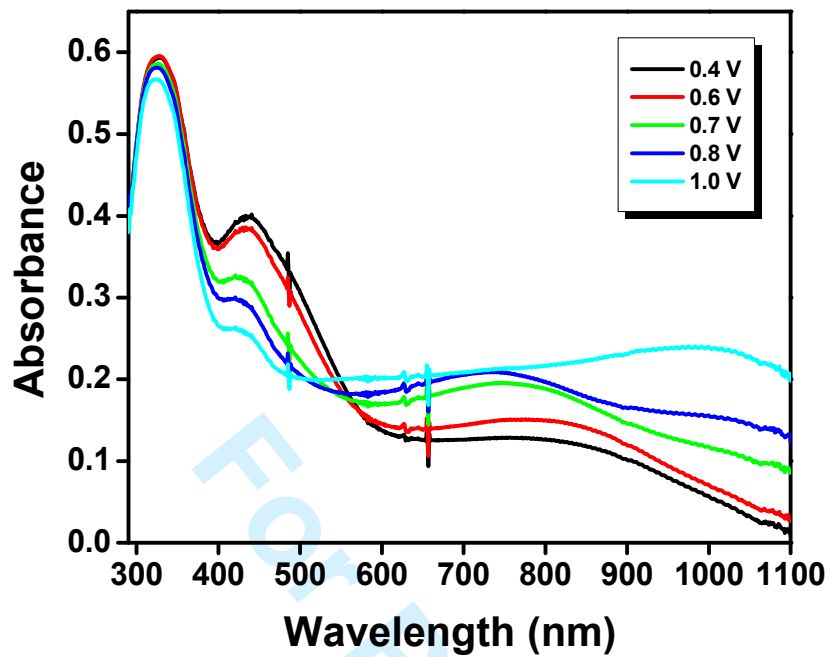


Figure 4. Spectroelectrochemistry of the P(TDAZO-co-Th)

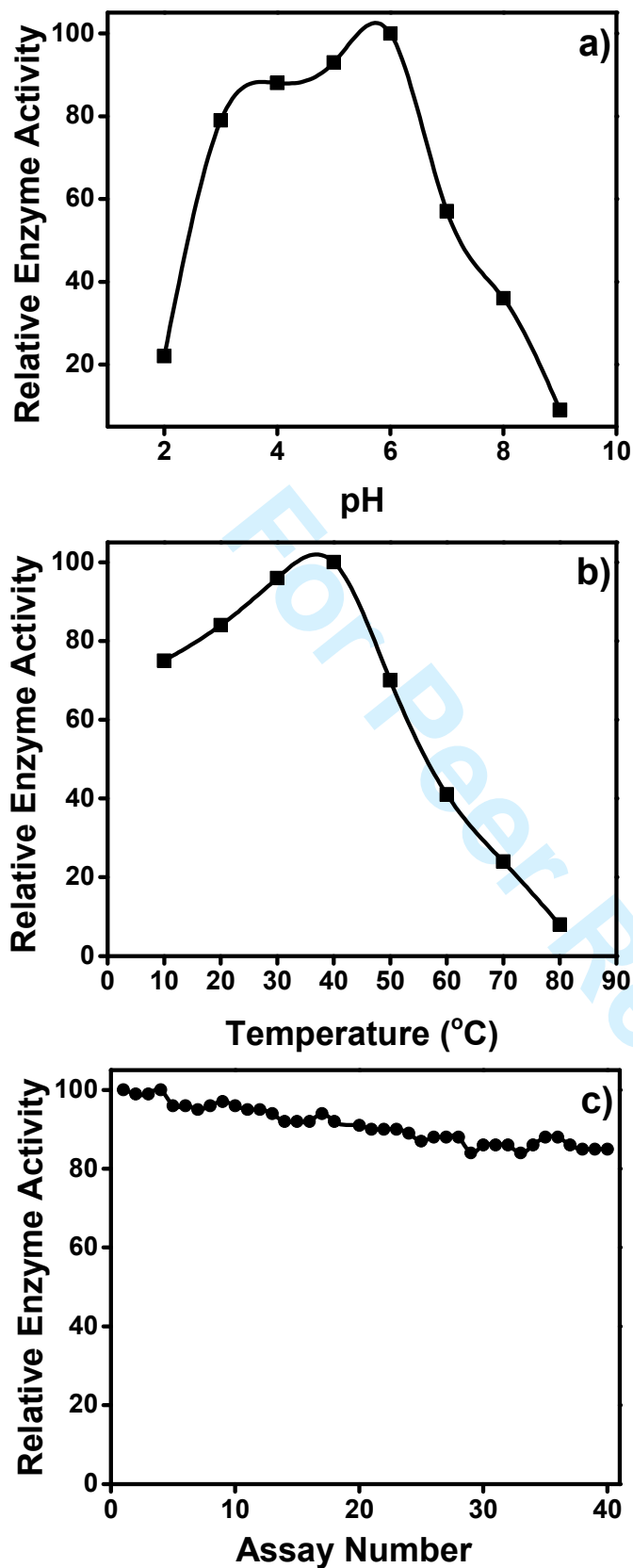


Figure 5 a) Effect of pH on invertase activity immobilized in P(TDAZO-co-Py) b) Effect of incubation temperature on invertase activity in P(TDAZO-co-Py) c) Operational Stability of P(TDAZO-co-Py)

Table 1. Kinetic parameters for free and immobilized invertase

	K_m mM	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$) protein
Free invertase	26.0	82.3
PPy/invertase	58.0	3.0
Copolymer/invertase	23.0	1.8

For Peer Review

A novel functional conducting polymer as an immobilization platform

Emine Güler^a, Hakan Can Soyleyici^b, Dilek Odaci Demirkol^{*a},

Metin Ak^{*c}, Suna Timur^a

^aEge University, Faculty of Science, Biochemistry Department 35100 Bornova-Izmir/Turkey

^bAdnan Menderes University, Faculty of Art and Science, Chemistry Department Aydin/Turkey

^cPamukkale University, Faculty of Art and Science, Chemistry Department Denizli/Turkey

Corresponding Authors:

*Assoc. Prof. Dr. Dilek ODACI DEMIRKOL

Ege University Faculty of Science Biochemistry Department 35100 Bornova-
Izmir/Turkey

Fax: +902323115485; Tel:+902323115487

E-mail:dilek.odaci@ege.edu.tr; dilek.demirkol@yahoo.com

*Assoc. Prof. Dr. Metin AK

Pamukkale University, Faculty of Art and Science, Chemistry Department,
Denizli/Turkey

Fax: +902582963535; Tel:+902582963595;

E-mail: metinak@pau.edu.tr

Abstract

Here we present the fabrication of conducting polymer based enzymatic and microbial biosensors. To obtain immobilization platforms for pyranose oxidase (PyOx) and *Gluconobacter oxydans*, the graphite electrode surface was modified with the polymer of 4-amino-N-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzamide (HKCN) which has free amino groups on the surface for the further bioconjugation reactions with the biomolecules. Initially, the electrode surface was covered with HKCN via electropolymerization. Then either PyOx or *G. oxydans* was stabilized using glutaraldehyde as a cross-linker. After optimization of biosensors, analytical characterization and surface imaging studies were investigated. The change of current depends on glucose concentration between 0.05-1.0 mM and 0.25-2.5 mM with HKCN/PyOx and HKCN/*G. oxydans* biosensors in batch system, respectively. And also calibration graphs were obtained for glucose in FIA mode, in this case linear ranges were found to be 0.01-1.0 mM and 0.1-7.5 mM for HKCN/PyOx and HKCN/*G. oxydans*, respectively.

Keywords: *Conducting polymers; HKCN monomer; pyranose oxidase; G. oxydans; biosensing*

1. Introduction

Biomolecule-based detection technology has become a dynamic area of research because of its remarkable potential for a variety of applications such as food/beverage industries [1-4], diagnosis of disease [5-9], bioprocess monitoring [10-12] and screening of environmental pollutants [13-17] etc. To improve stability of the biosensors for different requirements, modification of transducer surface for immobilization of bio-molecule is key point. Different strategies such as self-assembly monolayers [18-19], natural polymers (gelatin, chitosan etc.) [20-21], sol-gel method [22], conducting polymers [23-25] have been used to prepare immobilization platform. The use of conducting polymers in the design of biosensors is very common because of homogeneous and manageable film character, ability of modification of physical and optical properties, stability and biocompatibility, availability of various type of monomers, reproducible and easy production, efficient electron transfer ability [26-28]. The synthesis of novel conducting polymers donates the creativity of the fabricated bio-detection systems. And also the addition of functional groups to the monomer backbone provides special and targeted immobilization of bio-components and also improves the stability of bio-component onto conducting polymers because of linkage via covalent attachment [29]. For this aim, a new monomer containing amino groups has been designed in this study. In first part, novel type 2,5-di(2-thienyl)pyrrole derivative namely 4-amino-N-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzamide (HKCN) have been synthesized via reaction of 1,4-di(2-thienyl)-1,4-butanedione and p-aminobenzoyl hydrazide. Using hydrazide instead of amine is not only increase product yield but also improve properties of the corresponding polymer. Also optical properties of HKCN were described [30]. Herein, we present an electrochemical detection-based enzymatic and microbial biosensor for the determination of glucose. To immobilize biocomponent, electrochemical polymerization of HKCN on the surface of graphite electrodes was obtained. In the presence of glutaraldehyde as a cross-

linker, biocomponent was immobilized on the surface of HKCN-modified electrodes. After optimization of the biosensors, the characterization studies were carried out.

2. Materials and Method

Reagents

Pyranose oxidase (PyOx; pyranose: oxygen 2-oxidoreductase, E.C 1.1.3.10, from *Coriolus sp.*), D-glucose, D(+)-xylose, ethanol, glycerol, ascorbic acid were purchased from Sigma Chem. Co. and tetrabutylammoniumhexafluorophosphate (TBAPF₆) was purchased from Aldrich. Dichloromethane (DCM) was obtained from Merck. Glutaraldehyde solution (25%, v/v) was purchased from Sigma Aldrich. Commercial enzyme assay kit (Glucose MR, Cat. No. 1129010) was obtained from Cromatest. Aluminum chloride (AlCl₃) (Aldrich), succinyl chloride (Aldrich), hydrochloric acid (Merck), NaHCO₃ (Aldrich), MgSO₄ (Aldrich), propionic acid (Aldrich), toluene (Aldrich) were used as synthesis of monomer. All other chemicals were of analytical grade.

Apparatus

All the amperometric measurements were carried out by PalmSens Electrochemical Measurement Unit (Palm Instruments, Houten, Netherlands). In batch operations, experiments were performed in a reaction cell (10 mL) at room temperature using of three electrodes configuration, consisting of graphite working electrode, Ag/AgCl reference electrode (3M KCl, Metrohm, Switzerland) and a platinum counter electrode (Metrohm, Switzerland).

For the flow injection measurements the electrodes were mounted into an electrochemical flow-through cell of the cross-flow type with glassy carbon working, Ag/AgCl reference, and platinum wire counter electrodes (CHI130, Austin, www.chinstruments.com). FIA system contains a peristaltic pump (FIATron, Oconomovoc, WI, USA), an eight-port injection valve

(FIAtron, Oconomovoc, WI) and a cross-flow cell with three electrodes. The peristaltic pump equipped with Teflon tubing (0.50 mm inner diameter) carried 1.6 mL buffer solution per minute. Samples were injected with eight-port injection valve with a 100 μ L sample injection loop. The FIA system was connected to a PalmSens potentiostat for the electrochemical measurements.

Colorimetric experiments were performed with spectrophotometer Pharmacia LKB Novaspec II spectrophotometer (LKB Biochrom, England). Olympus BX53F Fluorescence microscope, Olympus DP72 camera and Uplanapo 100x objective were used in fluorescence images of monomer and prepared biosensors.

Cell cultivation

The strain of *G. oxydans* DSMZ 2343 was obtained from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany) and was sub-cultured on the agar containing (g/L): D-glucose, 100; yeast extract, 10; calcium carbonate, 20; agar, 20. Then, the cells were inoculated into liquid medium of the following composition, g/L: D-glucose, 5.0 and yeast extract, 5.0. Cells were grown at 28°C on a rotary shaker (175 rpm) in 250 mL flasks with 50 mL medium. Cell growth was followed spectrophotometrically by measuring the optical density at 600nm. Cells were collected in their late exponential phase, separated from culture medium by centrifugation (4000 rpm, 10 min), washed with sterile 0.9% NaCl solution and re-centrifuged. The obtained cellular paste was used for biosensor preparation [31].

Synthesis of HKCN

The monomer and its reagents (1,4-di(2-thienyl)-1,4-butanedione and p-aminobenzoyl hydrazide) were prepared according to the methods the literature [30]. All experiments were

carried out under dry argon by using Standard Schlenk techniques. Solvents were dried, distilled and saturated with argon.

A round-bottomed flask equipped with an argon inlet and magnetic stirrer was charged with 2.5 g (10 mmol) 1,4-di(2-thienyl)-1,4- butanedione, 1.51 g (10 mmol) p-aminobenzoyl hydrazide, 0.2 g (1.2 mmol) PTSA, 1 ml DMSO and 20 ml toluene. The resultant mixture was stirred and refluxed for 18 h under argon. Darkened solution was filtered hot to remove oily decomposition products. Then, the mixture was cooled to room temperature and the solid product was filtered off to give a yellow powder that was washed with pentane (3 x 15 ml) and air-dried, yield 3.1 g %85.

Preparation of HKCN/PyOx and HKCN/G. oxydans biosensors

Before each experiment, graphite rods (Ringsdorff Werke GmbH, Bonn, Germany, 3.05 mm diameter and 13% porosity) were polished on wet emery paper and rinsed thoroughly with distilled water to be used in batch operations. Glassy carbon electrodes (GCE) were cleaned by polishing with 0.05 μm alumina slurry followed by ultrasonication in ethanol and distilled water for 5 min to be used in flow injection mode of analysis (FIA).

A working electrode coated with the conducting polymer layer was used to immobilize either PyOx or *G. oxydans*. The polymer film was formed on the working electrode using ten voltammetric cycles between 1.0 V and -1.0 V at a scan rate of 0.1 V/s in TBAPF₆ (0.1M) / dichloromethane medium.

For the immobilization of enzyme, proper amounts of PyOx solution (0.5 mg in 5.0 μL , 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) and glutaraldehyde solution (5.0 μL , 1.0% in sodium phosphate buffer, pH 7.0) were spread over the polymer coated graphite electrode (in the case

of FIA mode, a glassy carbon electrode was used). Then the electrodes were allowed to stand at ambient conditions for 90 min.

For the immobilization of bacteria, 5.0 μL of *G. oxydans* cell ($0.68 \cdot 10^9$ cell titer), suspended in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0), was spread over the polymer coated graphite electrode (glassy carbon electrode for FIA) and glutaraldehyde solution (5.0 μL , 1.0% in sodium phosphate buffer, pH 7.0) added and the electrodes were allowed to dry at ambient conditions for 60 min. Daily inoculated cells were used for biosensor construction. Microbial biosensors containing fresh cells were daily prepared.

Measurements

The basic principle of the measurement was based on the following of oxygen consumption due to the catalytic activity of the enzyme or the respiratory activity of microorganisms (depending on the biological material) in the presence of glucose as a substrate. The decrease in the amount of oxygen was monitored at -0.7V versus the Ag/AgCl reference electrode.

Biosensing system was optimized at batch system and characterization studies were performed at Flow Injection Analysis (FIA) system. In the batch mode operations, the measurements were performed under constant magnetic stirring of the solution in the cell containing 10 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.5 or pH 7.0). The three electrodes were immersed into the cell and kept in working buffer solution for 5 min and working buffer solution has been refreshed after each measurements. After the current became constant, glucose was added to the reaction cell. Current value was recorded after a steady state current had been achieved. Biosensor response was obtained as the difference between first and second steady state currents. The electrodes were washed with distilled water after each measurement. In the flow injection analysis system, the three electrodes were integrated into a flow through cell and the measurements were carried out at room temperature in working

buffer. Glucose standard solutions and samples were applied as substrates by computer-controlled injection valve. The obtained current signals were plotted as a calibration curve and glucose concentrations in samples were determined using the calibration curve.

Sample application

The developed biosensors were examined with real samples (coke and fruit juice). Samples were degassed and diluted with working buffer and then injected into the FIA system. Calibration curves were used to determine the glucose contents in measured samples. The samples were also applied to a commercial enzyme assay kit based on spectrophotometric Trinder reaction (Cromatest, Glucose MR, Cat. No. 1129010) as the reference method and results were compared with those obtained with the constructed biosensors. In the Trinder reaction, the glucose is oxidized to D-gluconate by glucose oxidase (GOx) with the formation of hydrogen peroxide. In the presence of peroxidase (POD), a mixture of phenol and 4-aminoantipyrine (4-AAP) is oxidized by hydrogen peroxide to form a red quinoneimine dye proportional to the glucose concentration in the sample [32].

3. Results and Discussion

Synthesis and characterization studies of N-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)4-aminobenzamide was performed and published in our previous studies [30]. In the present study, pyranose oxidase (PyOx) and *Gluconobacter oxydans* were used as biological material for conducting polymer based biosensor systems. Conducting polymer of HKCN was electrochemically deposited onto a graphite electrode by cyclic voltammetry technique. For the electrochemical deposition of monomer cyclic voltammetry were used. Repeated potential scan electropolymerization of monomer in dichloromethane / TBAPF₆ (0.1 M) solvent-electrolyte system at a scan rate of 0.1 V/s on graphite up to ten cycles are shown in Figure 1.

<Figure 1>

After deposition of monomer, thickness of prepared conducting polymer film has been calculated as 6.8 nm and 4.7 nm for HKCN based PyOx and *G.oxydans* biosensors, respectively. After that, biological component of biosensor was immobilized on the surface of conducting polymer-modified electrodes via covalent attachment using glutaraldehyde (Scheme 1).

<Scheme 1>

Immobilization of biological materials was performed through covalent binding using the glutaraldehyde as bifunctional agent. Glutaraldehyde forms covalent bond between amino groups of electropolymerized monomer and amino groups of enzyme or free amino groups of cell surface. Poly(HKCN) deposition and immobilization of biocomponents were also monitored by fluorescence microscopy after formation on the ITO glass (Figure 2).

<Figure 2>

3.1 HKCN/PyOx biosensors

Optimization studies

In batch mode operations, the effect of several parameters such as pH, electrochemically deposition time and amount of biological material were optimized. Afterwards, developed biosensors were characterized at FIA mode. Firstly, the effect of pH and electrochemical polymerization time of monomer on the sensitivity of the HKCN/PyOx biosensor for glucose were optimized. The pH of buffer was varied from acidic to neutral (pH 5.0-7.0). The results were plotted against different pH to biosensor response %. According to Figure 3A, it has been found out that maximum activity was at pH 6.5. The optimum pH for free PyOx was 7.0-7.5 [33]. This decrease of pH is mainly because of the cationic character of HKCN. For the glucose biosensing using HKCN/PyOx with high sensitivity, the effect of

scan number of electrochemical deposition on the biosensor response was tested. The electrodes were modified with different scan numbers (10, 20 and 40 cycles) to determine the relationship between biosensor performance and conducting polymer film thickness (Figure 3B). 20 scans of electrochemical polymerization were found for high current levels. The diffusion distance becomes longer causing lower charge transfer rates because of increasing of the thickness of the polymer layer. When the number of scans was decreased lower thicknesses are considered, the functional groups on the electrode surface may not be enough to attach enzyme molecules on it. This may cause the decrease of stability. The results were coherent with other studies [34].

<Figure 3>

Analytical characteristics

After completing of optimization studies, chronoamperometric responses of HKCN/PyOx biosensors were recorded by adding of standard solutions of glucose to reaction buffer solution. Figure 4 shows the calibration curves for glucose (insets show current change depends on time after glucose addition). It can be seen that there is a linear relationship between the obtained current and the concentration of glucose in the concentration range of 0.05-1.0 mM (Figure 4A) and 0.01-1.0 mM (Figure 4B) with HKCN/PyOx biosensors in batch and FIA mode, respectively. To test repeatability of HKCN/PyOx biosensors, the biosensor signals corresponding to 0.5 mM glucose solutions were measured. The standard deviation and variation coefficient % were calculated as ± 0.019 and 3.5% (n: 10) in batch mode, respectively. Also in FIA mode, standard deviation and variation coefficient % were calculated as ± 0.003 and 4.8% (n: 12), respectively. To achieve operational stability of the HKCN/PyOx biosensor in FIA mode, 81 measurements were carried out and no decrease of activity was obtained.

<Figure 4>

To test the amperometric responses of HKCN/PyOx biosensor in FIA mode to different monosaccharides, galactose, xylose, mannose and fructose were injected into the reaction medium instead of glucose. When the biosensor response to glucose was admitted to 100, the responses of HKCN/PyOx biosensor to galactose, xylose, mannose and fructose were calculated as 27%, 31.2%, 28.5%, 32.7%, respectively (Figure 5A). The effects of common interfering compounds on the amperometric responses of the prepared HKCN/PyOx biosensor were also studied. The obtained current values were shown in Figure 5B.

<Figure 5>

Finally, the application of HKCN/PyOx biosensors to measure glucose content of real samples such as fruit juice, coke and drinks were carried out. For this aim, diluted samples were injected to the reaction medium instead of glucose. By utilization of calibration graphs to glucose, content of real samples were calculated and results were summarized in Table 1.

<Table 1>

3.2 HKCN/*G. oxydans* biosensors

Optimization studies

For the examination of the optimum pH values of the microbial biosensors, different buffer solutions were tested. The effect of the pH on the biosensor performance for 1.0 mM glucose was investigated by using 50 mM sodium phosphate buffer systems between pH 6.0-8.0. As given in Figure 6, the best result obtained at pH 7.0, it was chosen as the optimum working pH and used for the other experiments.

<Figure 6>

The second parameter investigated was the thickness of the conducting polymer films produced. The film thickness has a direct effect on the biosensor response, since stability of the polymer layer and response time of the biosensor highly depend on film thickness [35]. The amount of the conducting polymer on the electrode surface can be controlled by adjusting scan number of electropolymerization, which enhances homogeneous film formation on the electrode surface, regardless of its shape or size [36].

In order to detect the effect of polymer film thickness, polymers were deposited on the graphite working electrode with scans of 5, 10 and 20 cycles respectively. After the modification of electrodes, microbial biosensors were prepared as given in materials and method part. The relationship between the biosensor response and electropolymerization time is exhibited in Figure 7A. The best performance of the biosensor was recorded, when the polymer was deposited with 10 scan number. When, polymer layer thickness was increased, lower biosensor responses were observed. This might be due to the restricted adsorption and diffusion capacities to interact with target analyte. On the other hand, decreased responses were obtained with decreased film thickness due to lack of enough functional groups of the conducting polymer to keep the cells on the surface. As a result, the electrode prepared with 10-cycle electropolymerization was selected for subsequent experiments.

Finally, the effect of cell amount on biosensor response was tested. For this purpose, biosensors containing different amount of bacterial cell ($0.34 \cdot 10^9$, $0.68 \cdot 10^9$ and $1.36 \cdot 10^9$ cell titer, respectively) were prepared and the obtained current signals for glucose standard solutions were plotted as calibration curves for each biosensor (Figure 7B). The best current responses were measured when cell titer of $0.68 \cdot 10^9$ was used for biosensor construction. Therefore, all measurements were conducted by using this cell amount.

<Figure 7>

Analytical characteristics

The analytical characteristics of the developed microbial biosensor were investigated under the optimized experimental conditions. Linear calibration graphs were plotted for current (μA) versus glucose concentration (mM) for both batch and FIA modes. When the microbial sensor was applied for batch system, the linear range of the current response to glucose was found to be in the range from 0.25 mM to 2.5 mM of glucose with the equation, $y=0.102x + 0.216$ ($R^2 = 0.997$) (Figure 8A). The response time of the developed biosensing system was within 20 s after glucose addition. For the FIA combined microbial biosensor, linearity between current and glucose concentration was obtained in the range of 0.1-7.5 mM glucose given by the equation of $y= 0.046x + 0.118$ ($R^2 = 0.998$) (Figure 8B). The response time of the microbial biosensor was 10 s. The FIA combined microbial biosensor showed higher performance compared with the batch system with a corresponding short-response time and good linear range. In view of the general characteristics of FIA, it is highly automated system and it is suitable for process control owing to its intrinsic characteristics of rapidity, simplicity and versatility [37], [38].

<Figure 8>

The further characterization studies of the proposed microbial biosensing system were performed at FIA. During the FIA experiments, the same experimental conditions that were determined in batch experiments such as optimal pH, electropolymerization time and cell amount were used. The repeatability of the microbial biosensing system was examined for 2.5 mM glucose solution by 10 repetitive injections and standard deviations (SD) and coefficient of variation (cv) were calculated as ± 0.035 mM and 1.87%, respectively. Furthermore, the reproducibility of three electrodes, which were prepared under the same conditions on different days, was examined. The relative standard deviation (RSD) for three different electrodes was found as 4.6% for 1.0 mM glucose. Additionally, 66 repetitive measurements

were done using 7.5 mM glucose to investigate the operational stability of the system. 11% decrease of the response was observed after 3 h. According to our findings, it can be said that this biosensing system had a good repeatability and operational stability in our optimized working conditions. In order to increase performance of a biosensor, the basic requirement is relevant to usage a suitable immobilization method [39]. Conducting polymers form suitable environment for biomolecules and the usage of them for biomolecule immobilization provides construction of advanced biosensor devices because of its relative stability, ease of preparation and good conductivity [40], [29].

Our results reveal that the polymer provides a good platform and enables cells to keep their metabolic activity during the optimum experimental conditions. In order to examine the amperometric responses of HKCN/*G. oxydans* biosensors to different monosaccharides such as fructose, glucose, xylose and some alcohols such as ethanol and glycerol were used as substrate instead of glucose. The obtained results were given in Figure 9A. To evaluate the selectivity of HKCN/*G. oxydans* biosensors, the influences of common interferences on the detection of glucose were also tested. No current response was observed for ascorbic acid, phenol and uric acid, after that these interfering compounds were injected together with glucose and also no interfering effect of them was obtained for glucose detection (Figure 9B).

<Figure 9>

HKCN/*G. oxydans* biosensor was successfully applied to the determination of glucose in drinks. The obtained results were also compared to results which were found with spectrophotometric method. The good agreements were between the obtained values indicated that HKCN-based biosensors have a great potential in the practical glucose analysis in sample applications.

Conclusion

A novel monomer containing functional amino group was synthesized and characterized. PyOx and *Gluconobacter oxydans* cells as a model bio-component for enzyme and microbial sensors were chosen and immobilized on the surface of graphite electrodes which were modified with HKCN. Immobilization was carried out using glutaraldehyde as a cross-linker reagent. Because of simple fabrication procedure, easy application to automatized FIA system and low cost, it has been suggested that it has good potential for real sample analysis and they can be used in bio-fuel cell applications.

Acknowledgements

Authors gratefully thank the TUBITAK 111T074 and TUBITAK 2209-Research project supports for university students.

Author Biographies

Emine Güler received her B.Sc degree from Ege University, Department of Biochemistry in 2012. She is also a M.Sc student and interests with microbial and enzyme biosensors, conducting polymers, nanocomposite electrodes and preparation of fluorescence bioconjugates for cell imaging at Biochemistry department of Ege University.

Hakan Can Soyleyici currently a PhD candidate at Adnan Menderes University in Turkey. He obtained his B.Sc. (2003) and M.Sc. (2006) degrees from Pamukkale University and Adnan Menderes University respectively. He is currently working on new N-B heterocyclic compounds.

Dilek Odaci Demirkol received her M.Sc and PhD degree at Ege University Biochemistry Department in 2004 and 2010, respectively. She is an Associate Professor in Biochemistry department from Ege University. Her experience is about the preparation and modification of nanomaterial-modified electrodes and fluorimetric/electrochemical detection of various analytes such as carbohydrates, alcohol, microorganisms and cancer cells.

Metin Ak has received his M.Sc. degree in chemistry from Pamukkale University in 2001 and the Ph.D. degree in chemistry from Middle East Technical University in 2006. His fields of interest are conducting polymers, gas sensors, electroresponsive materials.

Suna Timur received her PhD degree in Biochemistry from Ege University, Turkiye in 2001. Currently, she is an Associate Professor at the Biochemistry department and works on enzyme and microbial biosensors and also nanoparticle and polymer-based cancer cells detection.

References

- [1] L.D. Mello, L.T. Kubota, Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, *Food Chemistry* 77 (2002) 237–256.
- [2] R. Monosik, M. Stredansky, J. Tkac, E. Sturdik, Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages, *Food Analytical Methods* 5 (2012) 40-53.
- [3] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, C. Adley, An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors, *Biotechnology Advances* 28 (2010) 232-254.
- [4] M. Nayak, A. Kotian, S. Marathe, D. Chakravorty, Detection of microorganisms using biosensors-A smarter way towards detection techniques, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2009) 661-667.
- [5] Paul D'Orazio, Biosensors in clinical chemistry, *Clinica Chimica Acta* 412 (2011) 1749-1761.
- [6] B.D. Malhotra, A. Chaubey, Biosensors for clinical diagnostics industry, *Sensors and Actuators B: Chemical* 91 (2003) 117-127.
- [7] A. Qureshi, Y. Gurbuz, J.H. Niazia, Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review, *Sensors and Actuators B: Chemical* 171–172 (2012) 62–76.
- [8] J.R. Windmiller, J. Wang, Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review, *Electroanalysis* 25 (2013) 29–46.
- [9] B. Pejcic, R. De Marco and G. Parkinson, The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases, *Analyst* 131 (2006) 1079–1090.
- [10] T.H. Scheper, J.M. Hilmer, F. Lammers, C. Müller, M. Reinecke, Biosensors in bioprocess monitoring, *Journal of Chromatography A* 725 (1996) 3–12.
- [11] T. Scheper, Biosensors for process monitoring, *Journal of Industrial Microbiology* 9 (1992) 163-172.
- [12] M. Akin, A. Prediger, M. Yuksel, T. Höpfner, D. Odaci Demirkol, S. Beutel, S. Timur, T. Scheper, A New Set up for Multi Analyte Sensing: At-Line Bio-Process Monitoring, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011) 4532–4537.
- [13] S. Rodriguez-Mozaz, M.P. Marco, M.J. Lopez de Alda, D. Barceló, Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (2004) 588-598.
- [14] A.J. Baeumner, Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (2003) 434-445.

- [15] I.E. Tothill, Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector *Computers and Electronics in Agriculture* 30 (2001) 205-218.
- [16] S. Kröger, S. Piletsky, A.P.F. Turner, Biosensors for marine pollution research, monitoring and control, *Marine Pollution Bulletin* 45 (2002) 24-34.
- [17] P.J. Vikesland and K.R. Wigginton, Nanomaterial Enabled Biosensors for Pathogen Monitoring - A Review, *Environ. Sci. Technol* 44 (2010) 3656–3669.
- [18] M. Yuksel, M. Akın, C. Geyik, D. Odaci Demirkol, C. Ozdemir, A. Bluma, T. Höpfner, S. Beutel, S. Timur, T. Scheper, Offline Glucose Biomonitoring in Yeast Culture by Polyamidoamine (PAMAM)/Cysteamine Modified Gold Electrodes, *Biotechnology Progress* 27 (2011) 530-538.
- [19] K. Damar, D. Odaci Demirkol, Modified Gold Surfaces by Poly(amidoamine) Dendrimers and Fructose Dehydrogenase for Mediated Fructose Sensing, *Talanta* 87 (2011) 67-73.
- [20] C. Özdemir, F. Yeni, D. Odaci, S. Timur, Electrochemical Glucose Biosensing by Pyranose Oxidase Immobilized in Gold nanoparticle-Polyaniline/AgCl/Gelatin Nanocomposite matrix, *Food Chemistry* 119 (2010) 380–385.
- [21] D. Odaci Demirkol, S. Timur, Chitosan matrices modified with carbon nanotube for use in mediated microbial biosensing, *Microchimica Acta* 173 (2011) 537–542.
- [22] N. Yildirim, D. Odaci, G. Ozturk, S. Alp, Y. Ergun, K.H. Feller, K. Dornbusch, S. Timur, Sol-gel encapsulated glucose oxidase arrays based on pH sensitive fluorescent dye, *Dyes and Pigments* 89 (2011) 144-148.
- [23] E. Baskurt, F. Ekiz, D. Odaci Demirkol, S. Timur, L. Toppare, Conducting Polymer of 4,7-di(2,3)-dihydrothienol[3,4-b][1,4]dioxin-5-yl-benzo[1,2,5]thiadiazole (BDT): Cell based Biosensing Applications and Adhesion Properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 97 (2012) 13-18.
- [24] C. Ozdemir, S. Tuncagil, D. Odaci Demirkol, S. Timur, L. Toppare, Design of Carbon Nanotube Modified Conducting Polymer for Biosensing Applications, *Journal of Macromolecular Science and Pure Applied Chemistry* 48 (2011) 503–508
- [25] S. Tuncagil, C. Ozdemir, D. Odaci Demirkol, S. Timur, L. Toppare, Gold Nanoparticle Modified Conducting Polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole-1-yl) benzenamine for Potential Use as a Biosensing Material, *Food Chemistry* 127 (2011) 1317–1322.
- [26] S. Tuncagil, D. Odaci, S. Varis, S. Timur, L. Toppare, Electrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1 H-pyrrole as a novel immobilization platform for microbial sensing, *Bioelectrochemistry* 76 (2009) 169-174.

- [27] K. Arshak, V. Velusamy, O. Korostynska, K. Oliwa-Stasiak, and C. Adley; Conducting Polymers and Their Applications to Biosensors: Emphasizing on Foodborne Pathogen Detection, *IEEE Sensors Journal* 9 (2009) 1942-195.
- [28] S. Demirci, F. B. Emre, F. Ekiz, F. Oguzkaya, S. Timur, C. Tanyeli and L. Toppare, Functionalization of poly-SNS-anchored carboxylic acid with Lys and PAMAM: surface modifications for biomolecule immobilization/stabilization and bio-sensing applications, *Analyst* 137 (2012) 4254-4261.
- [29] B.D. Malhotra, A. Chaubey, S.P. Singh, Prospects of conducting polymers in biosensors, *Analytica Chimica Acta* 578 (2006) 59–74.
- [30] H. C Söyleyici, M. Ak, Y. Sahin, D. O. Demirkol, S. Timur, New class of 2,5-Di(2-thienyl)pyrrole compounds and novel optical properties of its conducting polymer, Submitted to *Electrochimica Acta*, 2013.
- [31] O. Yilmaz, D. Odaci Demirkol, S. Gulcemal, A. Kılinc, S. Timur, B. Cetinkaya, Chitosan-Ferrocene Film as a Platform for Flow Injection Analysis Applications of Glucose Oxidase and *Gluconobacter oxydans* Biosensors, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 100 (2012) 62-68.
- [32] D. Barham, P. Trinder, *Analyst* 97 (1972).
- [33] I. Nishimura, K. Okada, Y. Koyama, Cloning and expression of pyranose oxidase cDNA from *Coriolus versicolor* in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* 52 (1996) 11–20
- [34] F. Ekiz Kanik, E. Rende, S. Timur and L. Toppare, A novel functional conducting polymer: synthesis and application to biomolecule immobilization, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 22517-22525.
- [35] L. Xia, Z. Wei, M. Wan, Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors, *J. Colloid Interface Sci* 341 (2010) 1–11.
- [36] J.C. Vidal, E. Garcia-Ruiz, J.R. Castillo, Recent advances in electropolymerized conducting polymers in amperometric biosensors, *Microchimica Acta* 143 (2003) 93–111.
- [37] J. Šefčovičová, J. Filip, V. Mastihuba, P. Gemeiner, J. Tkac, Analysis of ethanol in fermentation samples by a robust nanocomposite-based microbial biosensor, *Biotechnology Letters* 34 (2012) 1033–1039.
- [38] M.D. Luque de Castro and M.V. Cases. Simultaneous Determinations in Flow Injection Analysis: a review, *Analyst* 109 (1984) 413-419.
- [39] J. Tkac, V. Stefuca, P. Gemeiner, Biosensors with immobilised microbial cells using amperometric and thermal detection principles, In: *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, V. Nedović, R. Willaert (Eds.), Springer, New York, USA. (2005) 549-566.

- [40] T. Ahuja, I.A. Mir, D. Kumar, Rajesh, Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications: a review, *Biomaterials* 28 (2007) 791–805.

Tables

Table1. Results of determination of total glucose using HKCN/PyOx biosensor and spectrophotometric method in beverages.

Table 2. Results of determination of total glucose using HKCN/*G.oxydans* biosensor and spectrophotometric method in beverages.

Schemes and Figures

Scheme 1. Schematic representation of the proposed HKCN-based biosensors.

Figure 1. Repeated potential-scan electropolymerization of monomer in dichloromethane/TBAPF₆ (0.1 M) solvent-electrolyte system at a scan rate of 0.1 V/s on graphite (up to ten cycles).

Figure 2. Fluorescence images of poly(HKCN) before (A) and after immobilization of PyOx (B) and G. oxydans (B) under optimized conditions on ITO glass (with 40x and 100x magnification for HKCN/PyOx and HKCN/G.oxydans respectively).

Figure 3. Effect of pH (A) and scan number of electropolymerization (B) on the biosensor response of HKCN/PyOx biosensor (in sodium phosphate buffer, 50 mM, pH 6.5, -0.7 V). Error bars show S.D. of three measurements for each.

Figure 4. Calibration curve for glucose in batch mode (A) and FIA mode (B). (in sodium phosphate buffer, 50 mM, pH 7.5, -0.7 V). Error bars show S.D. of three measurements for each. Inset: Time dependent current response with the addition of 1 mM glucose for batch and FIA mode.

Figure 5. Substrate specificity of biosensor (A) (in sodium phosphate buffer, 50 mM, pH 6.5, -0.7 V). Effects of various interferents to electrode response in the presence of glucose (B) (in sodium phosphate buffer, 50 mM, pH 6.5, -0.7 V).

Figure 6. Effect of pH on the biosensor response. (pH 6.0-8.0 sodium phosphate buffer, 50 mM, -0.7 V, room temperature, 1.0 mM glucose). Error bars show S.D. of three measurements for each.

Figure 7. Effect of deposition time (A) and effect of cell amount on the biosensor response (B). (in sodium phosphate buffer, 50 mM, pH 7.0, -0.7 V). Error bars show S.D. of three measurements for each.

Figure 8. Calibration curve for glucose in batch mode (A) and FIA mode (B). (in sodium phosphate buffer, 50 mM, pH 7.0, -0.7 V). Error bars show S.D. of three measurements for each. Inset: Time dependent current response with the addition of 1 mM and 2.5 mM glucose for batch and FIA mode, respectively.

Figure 9. Substrate specificity of biosensor (A) (in sodium phosphate buffer, 50 mM, pH 7.0, -0.7 V). Effects of various interferents to electrode response in the presence of glucose (B) (in sodium phosphate buffer, 50 mM, pH 7.0, -0.7 V).

Tables

Table1

Sample	Glucose (M)*		
	HKCN/PyOx	Spectrophotometric	Recovery %
Coke	0.130 ± 0.016	0.126 ± 0.006	103
Fizzy	0.112 ± 0.009	0.113 ± 0.002	99
Fizzy (with orange)	0.175 ± 0.015	0.163 ± 0.001	107

*Results were given as mean±standard deviation (n:3).

Table 2

Sample	Glucose (M)*		
	HKCN/<i>G.oxydans</i>	Spectrophotometric	Recovery %
Fruit juice	0.131 ± 0.009	0.135 ± 0.001	97
Coke	0.106 M ± 0.0003	0.111 ± 0.013	95.5
Fizzy (with orange)	0.102 ± 0.003	0.105 ± 0.007	97

*Results were given as mean±standard deviation (n:3).

Manuscript Number: JELECHEM-D-13-00713

Title: Synthesis and Electropolymerization of 3,4- substituted Quinoxaline Functionalized Pyrrole Monomer and Optoelectronic Properties of its Polymer

Article Type: Regular Paper

Keywords: conducting polymers; electrochemical polymerization; electrochromism; spectroelectrochemistry

Corresponding Author: Dr. Metin Ak, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Pamukkale University

First Author: Gülbin Kurtay, Ph.D

Order of Authors: Gülbin Kurtay, Ph.D; Metin Ak, Ph.D; Mustafa Güllü, Ph.D; Levent Toppare, Ph.D; Mine S Ak, Ph.D

Manuscript Region of Origin: TURKEY

Abstract: We synthesized a new electroactive pyrrole functionalized monomer; 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]quinoxaline (BuDQP) where 2-positions of the pyrrole ring are blocked. With the help of this strategy, formation of 2-2 linkages during polymerization was prevented, resulting in a more regiochemically defined material. Characterization of newly synthesized compounds was performed by FTIR, GC-MS, 1H-NMR, 13C-NMR techniques and elemental analysis. Polymerization and copolymerization of BuDQP and characterization of the resulting polymers were also performed. Spectroelectrochemical investigations, switching abilities, colorimetry studies and stability experiments were performed on both for polymer and copolymer. Spectroelectrochemical analysis of P(BuDQP) reflected electronic transitions at 328 nm (π - π^* transition) and 500 nm (polaron bands) with an electronic band gap of 2.30 eV, while copolymer (P(BuDQP-co-Py)) revealed electronic transitions at 346 nm (π - π^* transition) and 518 nm (polaron bands) with an electronic band gap of 2.24 eV. Colorimetry studies revealed that P(BuDQP) has only two colors (blue and yellow) whereas copolymer film has six different colors in its oxidized and neutral states.

Suggested Reviewers: Yasemin Udum PhD
Assoc. Prof., Chemistry, Gazi University
y.udum@gazi.edu.tr

Ertugrul Sahmetlioglu PhD
Assoc. Prof., Chemistry, Florida State University
sahmetlioglu@gmail.com

Ali Cirpan PhD
Assoc. Prof., Chemistry, Middle East Technical University
acirpan@metu.edu.tr

Yusuf Nur PhD
Assoc. Prof., Chemistry, Mustafa Kemal University
ynur2005@gmail.com

Hüseyin B Yıldız PhD
Assoc. Prof., Chemistry, Karamanoglu Mehmet Bey Univ.
yildizhb@kmu.edu.tr

Professor J.M. Feliu

Departamento de Química Física,
Facultad de Ciencias,
Universidad de Alicante(Alicante, SPAIN)

Dear Prof. Dr. J.M. Feliu,

We would like to submit our revision of the original article entitled “Synthesis and Electropolymerization of 3,4-substitued Quinoxaline Functionalized Pyrrole Monomer and Optoelectronic Properties of its Polymer” to Journal Of Electroanalytical Chemistry.

In order to improve vital properties of pyrrole, we synthesized and characterized a new electroactive pyrrole functionalized monomer; 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo [3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]quinoxaline where β -positions of the pyrrole ring are blocked. With this strategy formation of α - β linkages during polymerization is prevented, resulting in a more regiochemically defined material. Polymerization and copolymerization of BuDQP and characterization of the resulting polymers were performed. Spectroelectrochemical investigations, switching abilities, colorimetry studies and stability experiments were performed on both for polymer and copolymer.

The article is original, has been written by the stated authors who are all aware of its content and approve its submission, has not been published previously, it is not under consideration for publication elsewhere, no conflict of interest exists, or if such conflict exists, the exact nature of the conflict must be declared and if accepted, the article will not be published elsewhere in the same form, in any language, without the written consent of the publisher.

Thank you for your consideration.

Yours Sincerely,

Assoc. Prof. Dr. Metin Ak

Pamukkale University, Department of Chemistry,
20020 Denizli, Turkey
Tel: +90 258 296 3595
Fax: +90 258 296 3535
metinak@pau.edu.tr
metin-ak@hotmail.com

HIGHLIGHTS

3,4- substituted quinoxaline functionalized pyrrole monomer was synthesized.

With this strategy formation of α - β linkages during polymerization is prevented.

Polymer film is exhibiting six distinct colors depending on the applied potential.

Synthesis and Electropolymerization of 3,4- substituted Quinoxaline Functionalized Pyrrole Monomer and Optoelectronic Properties of its Polymer

Gülbin Kurtay¹, Metin Ak^{2*}, Mustafa Güllü¹, Levent Toppare³, Mine Sulak Ak²

¹Ankara University, Faculty of Science, Chemistry Department, Ankara, Turkey

²Pamukkale University, Faculty of Art and Science, Chemistry Department, Denizli, Turkey

³Middle East Technical University, Faculty of Art and Science, Chemistry Department, Ankara, Turkey

Corresponding information:

Metin Ak (E-mail: metinak@pau.edu.tr , metin-ak@hotmail.com)

Abstract:

We synthesized a new electroactive pyrrole functionalized monomer; 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]quinoxaline (BuDQP) where β -positions of the pyrrole ring are blocked. With the help of this strategy, formation of α - β linkages during polymerization was prevented, resulting in a more regiochemically defined material. Characterization of newly synthesized compounds was performed by FTIR, GC-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR techniques and elemental analysis. Polymerization and copolymerization of BuDQP and characterization of the resulting polymers were also performed. Spectroelectrochemical investigations, switching abilities, colorimetry studies and stability experiments were performed on both for polymer and copolymer. Spectroelectrochemical analysis of P(BuDQP) reflected electronic transitions at 328 nm (π - π^* transition) and 500 nm (polaron bands) with an electronic band gap of 2.30 eV, while copolymer (P(BuDQP-co-Py)) revealed electronic transitions at 346 nm (π - π^* transition) and 518 nm (polaron bands) with an electronic band gap of 2.24 eV. Colorimetry studies revealed that P(BuDQP) has only two colors (blue and yellow) whereas copolymer film has six different colors in its oxidized and neutral states.

Keywords: Conducting polymers; Electrochemical polymerization; Electrochromism; Spectroelectrochemistry

1. Introduction

Electrochromism arises from the generation of different electronic absorption bands in the visible region, which corresponds to the changes between at least two redox states [1]. Conducting polymers (CPs) have attracted considerable interest as electrochromic materials since ingenious modifications on the monomer can significantly alter the spectral properties of the polymer. Such modifications may also alter the switching ability of the material between its oxidized and neutral states over many redox cycles [2-6]. They are usually colored in their reduced states due to the energy difference between π -bonding orbitals and the π^* -antibonding orbitals in the visible region. When a polymer is oxidized, the lower energy transitions become dominant and another color is formed.

Polypyrrole can easily be synthesized chemically or electrochemically and has a wide range of optoelectronic properties available through alkyl and alkoxy substitution which gives it an extensive value as an electrochromic material. The pristine polypyrrole however, has low quality electrochromic properties. It switches between gray and turquoise color which makes it unusable in electrochromic devices since it switches between two dark colors with a low optical contrast and moderate switching time in the visible region [7-9]. The material is also highly susceptible to degradation upon color switching. Compared to the immense literature on functionalized conducting polymers such as polythiophenes, [10-11] the number of functionalized polypyrrole derivatives are quite low, [12-16] though numerous studies have been conducted on pristine polypyrrole [17]. Polypyrrole is promising for several applications such as batteries, supercapacitors, electrochemical biosensors, conductive textiles and fabrics, mechanical actuators, electromagnetic interference shielding, anti-static coating, electrochromic devices and drug delivery systems [18-20]. Polypyrrole films with better chemical and physical properties can be produced by gaining better control on the structure [20-24].

Electrochemically prepared polypyrroles and other CPs suffer from undesired α - β and β - β couplings during polymerization.[25] Such defects not only deteriorate the conductive properties of the materials but also cause cross-linking which is particularly efficient in decreasing the solubility of the polymers.[26] The presence of β -capping moieties is thus the best solution. Also since the oxidized form of polypyrrole may be deprotonated by basic anions [27] and since the NH group may not favor solubility, a protection of the N-position may be desirable. Thus, a complete 1,3,4-substitution is the optimal achievement and this strategy may introduce novel features in its conductive properties [28].

In order to improve vital properties of pyrrole, we synthesized and characterized a new electroactive 3,4- substituted quinoxaline functionalized pyrrole monomer; 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]quinoxaline where β -positions of the pyrrole ring are blocked. With this strategy formation of α - β or β - β linkages during polymerization is prevented, resulting in a more regiochemically defined material. Polymerization and copolymerization of BuDQP and characterization of the resulting polymers were performed. Spectroelectrochemical investigations, switching abilities, colorimetry studies and stability experiments were performed on both for polymer and copolymer.

2. Experimental

2.1 Materials

N,N-Dimethylformamide (DMF) (*Sigma-Aldrich*) was dried over 4A molecular sieves and freshly distilled under reduced pressure prior to use. Doubly distilled water was used in the experiments. Dry solvents were stored over molecular sieves under nitrogen. The other reagents and chemicals; n-Butylamine (*Merck*), dichloromethane (DCM) (*Sigma-Aldrich*),

chloroform (*Sigma-Aldrich*), diethyl ether (*Sigma-Aldrich*), acetonitrile (ACN) (*Merck*), ethyl chloroacetate (*Sigma-Aldrich*), o-phenylenediamine (*Sigma-Aldrich*), diethyl oxalate (*Sigma-Aldrich*), 2,3-butanedione (*Sigma-Aldrich*), bromine (reagent grade, *Sigma-Aldrich*), acetic acid (*Merck*), ethanol (absolute, *Sigma-Aldrich*), potassium carbonate (anhydrous, *Fluka*), potassium hydroxide (ACS reagent, %85, *Sigma-Aldrich*), triethanolamine (*Sigma-Aldrich*), hydrochloric acid (ACS reagent, %37, *Sigma-Aldrich*), propylene carbonate (*Sigma-Aldrich*), tetrabutyl ammonium hexafluorophosphate (TBAFP) (*Sigma Aldrich*)] were purchased from the *indicated* commercial sources and used as received without any further purification.

2.2 Equipment

A Gamry Reference 600 potentiostat was used for the cyclic voltammetry studies and electrochemical syntheses. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of the synthesized compounds were recorded at room temperature on a Varian-Mercury 400MHz high performance digital Fourier Transform (FT)-NMR Spectrometer (Mercury-400BB) using CDCl_3 as the solvent and tetramethylsilane as the internal standard (0.00 ppm) relative to which the chemical shifts (δ) were given. The FT-IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer spectrometer (Spectrum 100). IR measurements for characterization of molecules were carried out with KBr pellets and/or ATR. Mass spectra were recorded with an Agilent Technologies 6890N Network GC system and Agilent Technologies 5975B VL MSD Mass Spectrometer operating at an ionization potential (EI) of 70 eV. Elemental analysis for C, H and N were performed with an Eurovector CHNS Elemental Analyser. Melting points (up to 350°C , uncorrected) were determined on an Electrothermal Programmable Melting Point Apparatus (IA9300). During the experiments, thin layer chromatography (TLC) was used to monitor the progress of reactions. To separate the desired product from unreacted starting materials, byproducts

and/or other impurities, column chromatography technique was performed. Therefore, TLC aluminum sheets (Merck, 20x20, Silica Gel 60 F₂₅₄) and silica gel (SiO₂) (Merck, Silica Gel 60, 0,063-0,200mm, 70-230 mesh ASTM) were used, respectively.

UV–vis-NIR spectra were recorded on a Varian Cary 5000 spectrophotometer at a scan rate of 2000 nm/min. Spectrophotometer was used to conduct the spectroelectrochemical experiments of polymer and copolymer. The indium tin oxide (ITO) coated glass plates of thickness of 0.7 mm with resistance of 8–12 Ω.sq⁻¹ were purchased from Delta Technologies Limited, USA, and used as such for spectroelectrochemical studies. The polymer films were deposited on ITO plates electrochemically using ITO coated plate as working electrode, a Pt counter electrode and silver wire (Fc/Fc+ (0.3V)) pseudo reference electrode in Gamry Reference 600 potentiostat.

Conductivity measurements were carried out on the pressed compact disc pellets of polymers having 12.7 mm of diameter and 0.5 mm of thickness using a four-point probe connected to a home-made conductivity meter. Conductivities were calculated based on the average of at least ten pairs of consistent readings taken at different points on the pressed polymer pellets.

2.3 Synthesis of 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxocino [6,7-b]quinoxaline (BuDQP)

Synthesis of the monomer was carried out following the route as shown in Scheme 1. The detailed synthetic procedures are as follows:

Diethyl N-butyl-iminodiacetate (I): To a 200-mL round bottomed flask containing a stirring bar; n-butylamine (4.24 g, 5.75 mL, 58 mmol, d: 0.74 g/mL) and dry K₂CO₃ (24.9 g, 180 mmol) in 50 mL of anhydrous acetonitrile were added and the mixture was stirred at room temperature, under nitrogen atmosphere for a period of time (~10 minutes) in order to provide

a homogeneous reaction environment. Ethyl chloroacetate (13.4 g, 11.7 mL, 110 mmol, d: 1.145 g/mL) was added drop-wise to the stirred reaction mixture over a period of 1 hour, after which the mixture was allowed to reflux for 9 hours. The reaction was monitored by TLC analysis. After completion of the reaction, K_2CO_3 was filtered off and the acetonitrile solution was evaporated. The remaining crude product was purified by distillation under reduced pressure to yield 12,9 g (85%) of diethyl N-butyl iminodiacetate as slightly yellow liquid (bp: 230-235 °C/ 100-150 mmHg).

1H -NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ_H /ppm: 0,85 (t, J=8,1 Hz, 3H, butyl $-CH_3$), 1,2 (t, J= 7,1 Hz, 3H, ester $-CH_3$), 1,25 (sextet, J=7,3 Hz, 2H, butyl $-CH_2$), 1,4 (p, J=6,2 Hz, 2H, butyl $-CH_2$), 2,65 (t, J=8,0 Hz, CH_2 , N- CH_2), 3,5 (t, 2H), 4,1 (q, J=6,1 Hz, 2H, ester $-CH_2$).

MS (EI) m/z (%) calcd. for $C_{12}H_{23}NO_4$: 245.3; found: 245.2 (M^+ , 6), 202 (6.3), 172 (100), 154 (2), 144 (3), 130 (30), 116 (6), 98 (5), 88 (3.5), 59 (7), 42 (15), 29 (5.4).

IR (KBr), ν_{max}/cm^{-1} : 2982-2874 (aliphatic C-H), 1747 (ester, C=O), 1467, 1376, 1190 (ester, C-O-C stretching), 1031 (C-N-C stretching), 976, 917.

Diethyl 1-butyl-3,4-dihydroxypyrrrole-2,5-dicarboxylate (2): To a 200-mL round bottomed flask containing a stirring bar and connected with a reflux condenser and a dropping funnel, clean sodium metal (1.61g, 70 mmol) and 30 mL of absolute ethanol were added carefully under nitrogen atmosphere. When the evolution of hydrogen gas was observed to diminish, the reaction mixture was heated in a hot water bath at 75-80°C and a mixture of diethyl N-butyl iminodiacetate (**1**) (7.36 g, 30mmol) and diethyl oxalate (4.38 g, 4 mL, 30 mmol, d: 1.076 g/mL) was added drop wise. Color of the mixture immediately became yellow-brown, and after refluxing for 4 hours, formation of a solid yellow chunk was observed. The reaction was maintained for an additional 1 hour and then flask contents were cooled to room temperature. The mixture was poured in an ice-water mixture and the solution was acidified to

pH~5 by adding glacial acetic acid. Primarily, the solution became like a milky liquid and then the formation of the crude product has occurred. The solids were separated from the solution by filtration and purified by recrystallization from ethanol to yield 6.75 g (75%) of diethyl 1-butyl-3,4-dihydroxypyrrrole-2,5-dicarboxylate as off-white solid (m.p: 58-60 °C).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 0,9 (t, J=7,2 Hz, 3H, butyl -CH₃), 1,3 (sextet, J=8,0 Hz, 2H, butyl -CH₂), 1,4 (t, J=6,8 Hz, 3H, ester -CH₃), 1,6 (p, J=7,6 Hz, 2H, butyl -CH₂), 4,4 (q, J=7,2 Hz, 2H, ester -CH₂), 4,5 (t, J=7,8 Hz, 2H, N-CH₂), 7,8 (s, 1H, -OH).

MS (EI) *m/z* (%) calcd. for C₁₄H₂₁NO₆: 299.3; found: 299 (M⁺, 28), 253 (100), 223 (1,5), 207 (60), 197 (4), 179 (18), 163,9 (94), 150,9 (14), 138 (2), 96 (1,5), 83 (1,8), 69 (4), 57 (5), 44 (78), 28 (22).

IR (ATR), ν_{max}/cm⁻¹: 3337, 3248 (O-H stretching), 2984-2864 (z, aliphatic C-H stretching), 1676,1641 (ester, C=O stretching), 1467-1305 (aliphatic C-H bending), 1262-1126 (ester, C-O-C symmetric and asymmetric stretching), 1023 (C-N-C stretching), 911, 871, 767, 695.

Elemental analysis: anal. calcd. for C₁₄H₂₁NO₆ (299.3): C 56.18 H 7.07 N 4.68; found: C 55.80 H 6.87 N 4.59.

1,4-Dibromo-2,3-butanedione (3): This compound was prepared according to the procedure used by Y. Zou [29]. Into a 250-mL round bottomed flask fitted with a reflux condenser and a dropping funnel, 2,3-butandione (10 g; 116 mmol) and 20 mL CHCl₃ were added. Bromine (37g, 12mL, 232 mmol, d: 3,1028 g/mL) diluted with 25 mL CHCl₃ was dropped slowly to the reaction mixture, and then the reaction proceeded at 50 °C until no HBr evolution was observed. The crude mixture was chilled in the refrigerator overnight, and the precipitate product was filtered out. A yellow solid was obtained after recrystallization of the crude product from CHCl₃ to yield 23 g (82%) of 1,4-dibromo-2,3-butanedione (observed m.p: 116 °C, lit. m.p:116-117 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 4.30 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{Br}$).

Elemental analysis: anal. calcd. for $\text{C}_4\text{H}_4\text{Br}_2\text{O}_2$ (243.9): C 19.70 H 1.65 found: C 18.86 H 1.50.

2,3-Bis(bromomethyl)quinoxaline (4): This compound was prepared according to a previously used literature procedure [30]. According to this method, o-phenylenediamine (3 g, 22 mmol) was dissolved in 5 mL ethanol in an Erlenmeyer flask. In a separate flask 1,4-dibromo-2,3-butanedione (**3**) (6.4g, 22 mmol) was also dissolved in 5 mL ethanol. Both solutions were mixed together slowly over an ice bath and were stirred for 1 h. After cooling the solution in the refrigerator overnight, precipitated 2,3-bis(bromomethyl)quinoxaline (6.3 g) was obtained as light brown powder with a yield of 82% (observed m.p: 150°C , lit. m.p: $151\text{-}152^\circ\text{C}$).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 4.9 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{Br}$), 7.8 (d, 2H, arom.), 8.1 (d, 2H, arom.).

IR (ATR), $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3019 (aromatic, C-H stretching), 2978-2901 (aliphatic, C-H stretching), 1456 (aliphatic C-H bending), 764 (ξ , aromatic, C-H bending).

MS (EI) m/z (%) calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{Br}_2\text{N}_2$: 316; found: 316 (M^+ , 28), 235 (100), 156 (81), 142 (8), 129 (17), 102 (13), 89 (17), 76 (19), 63 (10), 50 (17).

Diethyl 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxoxino[6,7-b]quinoxaline-1,3-dicarboxylate (5): Diethyl 1-butyl-3,4-dihydroxypyrrole-2,5-dicarboxylate (**2**) (0.9 g, 3 mmol) was dissolved in 15 mL anhydrous DMF in a 100-mL round bottomed flask under nitrogen atmosphere. Dry K_2CO_3 (1.24g, 9 mmol) and 2,3-bis(bromomethyl)quinoxaline (0.95 g, 3 mmol) were added to the solution and the mixture was heated at 100°C for 6 hours. After completion of the reaction, the mixture was poured into 100 mL ice-water. The

precipitated crude product was filtered off, washed with 25 mL water once, and with 25 mL 0.1 N potassium hydroxide solution twice. Recrystallization was performed from diethyl ether to yield 1.2 g (88%) of diethyl 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxoxino[6,7-b]quinoxaline-1,3-dicarboxylate as brown solid (m.p: 145-147 °C).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 0,9 (t, J=7,2 Hz, 3H, butyl -CH₃), 1,29 (sexlet, J=7,9 Hz, 2H, butyl -CH₂), 1,43 (t, J=6,8 Hz, 6H, ester -CH₃), 1,63 (p, J=7,6 Hz, 2H, butyl -CH₂), 4,37 (q, J=7,2 Hz, 4H, ester -CH₂), 4,6 (t, J=7,8 Hz, 2H, N-CH₂), 5,74 (s, 4H), 7,78 (dd, 2H, arom.), 8,07 (dd, 2H).

MS (EI) *m/z* (%) calcd. for C₂₄H₂₇N₃O₆: 453.2; found: 453.2 (M⁺, 90), 380 (90), 352 (45), 324 (30), 297 (100), 278 (20), 268 (22), 194 (20), 156 (35).

IR (ATR), ν_{max}/cm⁻¹: 2962, 2932, 2872 (aliphatic, C-H stretching), 1713, 1689 (ester, C-O stretching), 1463, 1439 (aliphatic, C-H bending), 1309 (C-H symmetric bending), 1263 (ester, C-O-C asymmetric stretching), 1153, 1069, 1031 (ester, C-O-C symmetric stretching).

Elemental analysis: anal. calcd. for C₂₄H₂₇N₃O₆ (453.5): C 63.56 H 6.00 N 9.27; found: C 63.02 H 5.45 N 8.89.

2-Butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]quinoxaline-1,3-

dicarboxylic acid (6): Diethyl 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxoxino[6,7-b]quinoxaline-1,3-dicarboxylate (**5**) (0.91 g, 2 mmol) and 15 mL ethanol were put into a round bottomed flask fitted with a reflux condenser. After the addition of KOH (85%, 0.4 g, 6 mmol) and 1 mL distilled water, the mixture was refluxed in hot water bath for 5 hours. After completion of the reaction, the excess ethanol was removed by distillation. Unreacted ester was extracted with ether and then the residue was mixed with crushed ice. The cooled water phase was acidified with concentrated HCl (pH~2-3). The resulting cream-colored product was separated by filtration to yield 0.76 g (95%) of 2-butyl-5,12-dihydro-2H-

pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]quinoxaline-1,3-dicarboxylic acid as gray powder (m.p: 199 °C).

IR (ATR), $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3374-2516 (O-H stretching), 2961-2873 (aliphatic, C-H stretching), 1705 (carboxylic acid, C-O stretching), 1440 (C-H symmetric bending), 1237 (C-O-C asymmetric bending), 1074 (C-O-C symmetric stretching).

2-Butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]quinoxaline (7): The dicarboxylic acid derivative; 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]quinoxaline-1,3-dicarboxylic acid (**6**) (0.225 g, 0.57 mmol) and 5 mL triethanolamine were stirred under a nitrogen flow in a preheated oil bath at 130 °C for 30 minutes. The flask content was cooled down to room temperature, and mixed with ice-water. Organic phase was extracted with dichloromethane, washed with brine and water. DCM was removed under reduced pressure after drying the organic layer over anhydrous sodium sulfate.

The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Hexane}$, 1:1, v/v) to give 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]quinoxaline as light yellow solid (0.114 g) in 65% yield (m.p: 98 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 0,9 (t, $J=7,5$ Hz, 3H, butyl $-\text{CH}_3$) 1,3 (sextet, $J=7,9$ Hz, 2H, butyl $-\text{CH}_2$), 1,65 (p, $J=7,8$ Hz, 2H), 3,65 (t, $J=7,5$ Hz, 2H), 5,5 (s, 4H), 6,2 (s, 2H), 7,75 (dd, 2H, arom.) 8,0 (dd, 2H, arom.).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 14, 20, 33, 50, 77, 106, 129, 130, 136, 141, 152.

MS (EI) m/z (%) calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$: 309.2; found: 309.2 (M^+ , 65), 238 (35), 197 (25), 169 (100), 134 (15), 102 (10), 68 (15), 41 (20).

IR (ATR), $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2964, 2942, 2924, 2870 (aliphatic, C-H stretching), 1352 (C-H symmetric bending), 1037, 1019 (C-O-C symmetric stretching).

Elemental analysis: anal. calcd. for $C_{18}H_{19}N_3O_2$ (309.2): C 69.88 H 6.19 N 13.58; found: C 68.94 H 6.05 N 12.98.

<<Scheme 1>>

2.4 Cyclic voltammetry (CV)

The oxidation/reduction behaviors of the monomer were investigated by cyclic voltammetry technique. The system consisted of a potentiostat and a CV cell containing indium tin oxide coated glass slide (ITO) as working, platinum wire as counter and silver wire reference electrode. Ag wire was calibrated with respect to ferrocene/ferrocenium redox couple (Fc/Fc^+). Measurements were carried out in different solvents and TBAFP supporting electrolyte.

2.5 Electrochemical polymerization and copolymerization

Electrochemical polymerization of the monomer via constant potential electrolysis was performed in a single compartment cell equipped with ITO coated glass slide working and platinum wire counter electrodes and a Ag wire reference electrode in the presence of 0.01 M monomer (BuDQP), 0.05 M TBAFP in propylene carbonate (PC) with the application of 1.2 V. After electrolysis, polymer film was washed with PC several times to remove unreacted monomer. The electrochromic measurements; spectroelectrochemistry, and switching studies of the polymer were carried out in same media in the absence of monomer.

Pyrrole was used as the co-monomer for the synthesis of conducting copolymer of BuDQP. The ratio of the monomers (Py: BuDQP) was 1:4 Since BuDQP is a bulky electroactive monomer, use of excess BuDQP was found to be appropriate. BuDQP (0.01M) was dissolved

in 10 ml of PC and Py (2,5 mM) were introduced into the single compartment electrolysis cell. TBAFP was used as the supporting electrolyte. A constant potential of 1.2 V was applied for 10 min under an inert atmosphere.

<<Scheme 2>>

2.6. Colorimetry measurements

The sample was illuminated from behind by a D50 (5000 K) light source in a light booth specially designed to exclude external light. Background measurements were taken using a blank electrochemical cell containing solvent and ITO glass.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and Characterization

The synthetic route to obtain desired monomer is shown in Scheme 1. In the first step, starting compounds **2** and **4** prepared as shown in the reaction scheme, were reacted to produce diethyl 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxoxino[6,7-b]quinoxaline-1,3-dicarboxylate (**5**). Then, the synthesis of BuDQP was accomplished by hydrolysis (**vi**) and decarboxylation (**vii**) reactions of diester **5**, respectively. The structure of BuDQP was confirmed by NMR spectral analysis. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrum of the BuDQP has the characteristic peaks, as shown in Fig. 1 and supports the chemical structure of the monomer satisfactorily.

<<Figure 1>>

3.2. Cyclic voltammetry

0.01 M solution of BuDQP was polymerized by repeated potential scanning (250 mV/s) between 0.0 and +1.0 V vs Ag wire in different solvents (DCM, ACN and PC) using a standard three electrode cell on a Pt wire working electrode under an inert atmosphere. 0.05 M TBAFP was used as supporting electrolyte in all solvents. During the polymerization, an electroactive polymer film forms on the electrode surface. However, oxidation and reduction peak values of the polymer and shapes of cyclic voltammograms are different in each solvent. Fig. 2 shows cyclic voltammograms and oxidation-reduction peak values of BuDQP in different solvents.

<<Figure 2>>

To investigate the electroactivity of the copolymer, we performed CV studies in the presence of pyrrole. BUDQP (0.01M) was dissolved in 10 ml of PC and Py (2.5 mM) were introduced into the single compartment electrolysis cell. TBAFP was used as the supporting electrolyte. A three-electrode cell containing ITO-coated glass slide as the working electrode, a platinum foil as the counter electrode, and a silver wire as the pseudo reference were used. There was a drastic change in the voltammogram, both the increase in the increments between consecutive cycles and the oxidation potential of the material was different than those of pure pyrrole and BuDQP, which in fact could be interpreted as the formation of copolymer, which needs to be supported by other means of characterization (Fig. 3).

<<Figure 3>>

3.3. Spectroelectrochemistry of P(BuDQP)

The best way of examining the changes in optical properties of conducting polymers upon voltage change is spectroelectrochemistry. These experiments reveal key properties of conjugated polymers such as band gap (E_g) and the intergap states that appear upon doping. The energy gap between bipolaron band and conduction band determines the color in oxidized state. These are all dependent on the conjugation of the polymer, the electrochemical nature of side groups and their effects on the polymer backbone. There are basically five documented contributors that influence the band gap of the conjugated polymer, namely the energy related to the bond alternation ($E^{\Delta r}$), the mean deviation from planarity (E^{θ}), the aromatic resonance energy (E^{Res}), the inductive and mesomeric electronic effects of substituents (E^{Sub}) and interchain interactions (E^{Int}).

Spectroelectrochemical analysis of the P(BuDQP) film was studied in order to elucidate electronic transitions upon doping of the polymer (Fig.4). P(BuDQP) was coated on ITO and spectral changes were explored by UV-vis-NIR spectrometer in a monomer-free 0.05M TBAFP in PC via incrementally increasing applied potential between -0.6 and $+1.0$ V. Upon applied voltage, decrease in the intensity of the π - π^* transition (328 nm) and formation of charge carrier bands were observed. There was a gradual decrease in the peak intensity at around 328 nm upon increase in the applied potential, which was accompanied by the increase in the intensity of peaks at around 500 nm due to the formation of polaron bands at interval potentials. The onset energy for the π - π^* transition (electronic band gap) was found to be 2.30 eV.

To investigate the spectroelectrochemical behavior of the copolymer P(BuDQP-co-Py), films were deposited onto ITO-coated glass slides in TBAFP/PC potentiodynamically between -1.0

and 1.0 V. Spectroelectrochemical properties were studied in the same environment but monomer free solution. The λ_{\max} value for the π - π^* transitions in the neutral state of copolymer was found to be 346 nm, revealing light orange color which are all significantly different than pure polypyrrole and P(BuDQP). The electronic band gap defined as the onset energy for the π - π^* transition was found to be 2.24 eV. Upon increase in the applied voltage, the evolution of a new absorption band at 518 nm was observed due to evolution of charge carriers (Fig. 5), which was accompanied by gradual decrease in the intensity of the bands at λ_{\max} .

<<Figure 5>>

3.4. Colorimetry

The colors of the electrochromic materials were defined accurately by performing colorimetry measurements. CIE system was used as a quantitative scale to define and compare colors. Three features of color; hue (a), saturation (b) and luminance (L) were measured and recorded in Table 1. The P(BuDQP) film shows two different colors in the fully reduced (0.0 V) and oxidized states (+1.0 V). The color of the film switches from a blue color in the oxidized form to yellow in the reduced state (Fig 6a). The pristine polypyrrole has electrochromic properties of low quality. It has a high band gap. It switches between gray and turquoise which makes it not usable in electrochromic devices. Since it switches between two dark colors its optical contrast is low with a moderate switching time in the visible region [9]. However the copolymer P(BuDQP-co-Py), reveals multichromic property with five different colors with

applied potentials between -1.0 and $+1.0$ V. Fig. 6b. Colors of the P(BuDQP) and P(BuDQP-*co*-Py) were shown in Fig 6.

<<Figure 6>>

<<Table 1>>

3.5. Electrochromic switching of P(DDQ)

The spectroelectrochemistry experiments showed the ability of P(BuDQP) to switch between its neutral and doped states with a change in transmittance at a fixed wavelength. A square-wave potential step method coupled with optical spectroscopy, known as chronoabsorptometry was used to probe switching times and contrast in these polymers. In this double potential step experiment, the potential was set at an initial potential for a set period of time (5 s) and was stepped to a second potential for another set period of time (5 s), before being switched back to the initial potential again. The polymer films are synthesized on ITO-coated glass slides using constant potential and the experiment performed in monomer free solution. The transmittance, ΔT , was then monitored at 1200 nm while the polymer was switched from -0.6 to $+1.0$ V. Maximum contrast of the P(BuDQP) and P(BuDQP-*co*-Py) was measured at 1200 nm, and found as 32% with a switching time of 0.4 s for P(BuDQP) while 21% with a switching time of 1.1 s for P(BuDQP-*co*-Py) (Fig. 7).

<<Figure 7>>

3.6. Scan rate dependence of the peak currents

One of the characteristics of a CV of a conducting polymer (CP) film is the dependence of the peak current (i_p) on the scan rate (v). According to electrochemical treatments, for a behavior

dominated by diffusion effects, i_p is proportional to $v^{1/2}$, whilst for a material localized on the electrode surface, such as a CP film, i_p is proportional to v . However, this is so only for CP films that are not inordinately thick, not inordinately compact and not doped with very large or sluggish dopant ions which have inordinately small diffusion coefficients. If any of the latter conditions prevail i_p can be proportional to $n^{1/2}$. P(BuDQP) and P(BuDQP-*co*-Py) films prepared via constant potential electrolysis (1.2 V) were washed with AN and their cyclic voltammograms in monomer free electrolyte showed a single, well-defined redox process (Fig 8a and b). The current response was directly proportional to the scan rate indicating that the polymer film was electroactive and adhered well to the electrode. The scan rate for the anodic and cathodic peak currents shows a linear dependence as a function of the scan rate as illustrated as inset in Figures 8a and 8b for the P(BuDQP) and P(BuDQP-*co*-Py) films respectively. This demonstrates that the electrochemical processes are not diffusion limited and reversible even at very high scan rates.

<<Figure 8>>

3.7. Stability

Redox stability of the conducting polymers toward multiple redox switching usually limits the utility of electrochromic materials in ECD applications. The main reasons for device failure are; high applied voltages and environmental conditions. Cyclic voltammetry was employed to figure out the long term stability of the conducting polymers. To test the stability of the polymers, the potential was swept repeatedly between 0.0 and -2.3 V for P(BuDQP) and between -0.7 V and $+1.3$ V for P(BuDQP-*co*-Py) with a scan rate of 500 mVs^{-1} . As seen from Fig. 9a, almost all initial electroactivity was maintained proving that P(BuDQP) has good environmental and redox stability. Between the 1st and 1000th cycles only a limited decrease

(~10%) in the current response was observed (Fig 9b), which shows that the P(BuDQP-*co*-Py) have reasonable environmental and redox stability.

<<Figure 9>>

4. Conclusions

Synthesis of monomer; 2-butyl-5,12-dihydro-2H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]quinoxaline (BuDQP) was successfully achieved. The electrochemical oxidative polymerization of BuDQP was performed via potentiodynamic method using TBAFP as the supporting electrolyte in PC. Spectroelectrochemical analyses showed that P(BuDQP) has an electronic band gap (due to π - π^* transition) of 2.30 eV at 328 nm. It has a light yellow color in the fully reduced form and a blue color in the fully oxidized state.

Copolymerization of distinct monomer can lead to an interesting combination of the properties observed in the corresponding homopolymers and is a logical approach for color fine-tuning with a view to electrochromic applications. The P(BuDQP-*co*-Py) film has an electronic band gap (due to π - π^* transition) of 2.24 eV at 346 nm. Furthermore, the copolymer films are multielectrochromic, exhibiting six distinct colors depending on the applied potential, not to mention their high absorption in the NIR region. These features are interesting for application of this material as active layer in optoelectronic devices, such as displays and smart windows.

Acknowledgments

One of the authors (M.Ak) gratefully thank to the Scientific and Technological Research Council of Turkey-TÜBİTAK (TBAG/101T074). M. Güllü and G. Kurtay also acknowledge herewith the support provided by TÜBİTAK (TBAG/110T071).

References

- [1] D. R. Rosseinsky, R. J. Mortimer, Electrochromic systems and the prospects for devices, *Adv. Mater.* 13 (2001) 783–793.
- [2] C. L. Gaupp, K. Zong, P. Schottland, B. C. Thompson, C. A. Thomas, J. R. Reynolds, Poly(3,4-ethylenedioxyppyrrrole): Organic electrochemistry of a highly stable electrochromic polymer, *Macromolecules* 33 (2000) 1132–1133.
- [3] G. Sönmez, I. Schwendeman, P. Schottland, K. Zong, J. R. Reynolds, N-Substituted poly(3,4-propylenedioxyppyrrrole)s: High gap and low redox potential switching electroactive and electrochromic polymers, *Macromolecules* 36 (2003) 639–647.
- [4] A. T. Taşkın, A. Balan, B. Epik, E. Yıldız, Y. A. Udum, L. Toppare, A novel quinoxaline bearing electroactive monomer: Pyrrole as the donor moiety, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 5449–5453.
- [5] M. İçli, M. Pamuk, F. Algi, A. M. Önal, A. Cihaner, Donor–acceptor polymer electrochromes with tunable colors and performance, *Chem. of Mater.* 22 (2010) 4034–4044.
- [6] M. S. Ak, M. Ak, M. Güllü, L. Toppare, Synthesis and electropolymerization of 5,12-dihydrothieno[3',4':2,3][1,4]dioxocino[6,7-b]-quinoxaline and its electrochromic properties, *Eur. Polym. J.* 43 (2007) 3452–3460.
- [7] I. Schwendeman, R. Hickman, G. Sönmez, P. Schottland, K. Zong, D. M. Welsh, J. R. Reynolds, Enhanced contrast dual polymer electrochromic devices, *Chem. Mater.* 14 (2002) 3118–3122.
- [8] M. Ak, B. Gacal, B. Kiskan, Y. Yağcı, L. Toppare, Enhancing electrochromic properties of polypyrrrole by silsesquioxane nanocages, *Polym.* 49 (2008) 2202–2210.
- [9] J. Roncali, Conjugated poly(thiophenes): Synthesis, functionalization, and applications, *Chem. Rev.* 92 (1992) 711–738.

- [10] R. D. McCullough, The chemistry of conducting polythiophenes, *Adv. Mater.* 10 (1998) 93–116.
- [11] S. Tarkuç, E. Şahmetlioğlu, C. Tanyeli, I. M. Akhmedov, L. Toppare, A soluble conducting polymer: 1-Phenyl-2,5-bis(2-thienyl)-1H-pyrrole and its electrochromic application, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5412–5419.
- [12] H. Masuda, K. Kaeriyama, Electrochemical preparation of poly(3-propanoylpyrrole) and poly(3-phenylpyrrole), *Synth. Met.* 38 (1990) 371–379.
- [13] J. Chen, C. O. Too, G. G. Wallace, G. F. Swiegers, B. W. Skelton, A. H. White, Redox-active conducting polymers incorporating ferrocenes. Preparation, characterization and bio-sensing properties of ferrocenylpropyl and -butyl polypyrroles, *Electrochim. Acta* 47 (2002) 4227–4238.
- [14] D. Lee, T. M. J. Swager, Defining space around conducting polymers: Reversible protonic doping of a canopied polypyrrole, *Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 6870–6871.
- [15] P. Godillot, H. K. Youssoufi, P. Srivastava, A. El Kassmi, F. Garnier, Direct chemical functionalization of as-grown electroactive polypyrrole film containing leaving groups, *Synth. Met.* 83 (1996) 117–123.
- [16] S. Sadki, P. Schottland, N. Brodie, G. Sabouraud, The mechanisms of pyrrole electropolymerization, *Chem. Soc. Rev.* 29 (2000) 283–293.
- [17] M. Ak, V. Gancheva, L. Terlemezyan, C. Tanyeli, L. Toppare, Synthesis of a dipyrromethane functionalized monomer and optoelectrochromic properties of its polymer, *Eur. Polym. J.* 44 (2008) 2567–2573.
- [18] J. Rodriguez, H. J. Grande, T. F. Otero, *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers Volume 4*, first ed., Wiley, New York, 1997.
- [19] B. Scrosati, *Applications of Electroactive Polymers*, first ed., Chapman & Hall, London, 1993.

- [20] J. Simonet, J. R. Berthelot, Electrochemistry: A technique to form, to modify and to characterize organic conducting polymers, *Prog. Solid State Chem.* 21 (1991)1–48.
- [21] A. Cihaner, O. Mert, A. S. Demir, A novel electrochromic and fluorescent polythienylpyrrole bearing 1,1'-bipyrrole, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 1333–1338.
- [22] H. C. Söyleyici, M. Ak, Y. Şahin, D. O. Demirkol, S. Timur, New class of 2,5-Di(2-thienyl)pyrrole compounds and novel optical properties of its conducting polymer, *Mater. Chem. Phys.* (2013) in press.
- [23] M. Ak, E. Şahmetlioğlu, L. Toppare, Synthesis, characterization and optoelectrochemical properties of poly(1,6-bis(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)hexane) and its copolymer with EDOT, *J. Electroanal. Chem.* 621 (2008) 55–61.
- [24] G. B. Street, T. C. Clarke, M. T. Kroumbi, K. K. Kanazawa, V. Y. Lee, P. Pfluger, J. C. Scott, G. Weiser, Preparation and characterization of neutral and oxidized polypyrrole films, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 83 (1982) 253–264.
- [25] M. Leclerc, F. M. Diaz, G. Wegner, Structural analysis of poly(3-alkylthiophene)s, *Macromol. Chem.* 190 (1989) 3105–3116.
- [26] Q. Pei, R. Qian, Protonation and deprotonation of polypyrrole chain in aqueous solutions, *Synth. Met.* 45 (1991) 35–48.
- [27] G. Zotti, S. Zecchin, G. Schiavon, L. “Bert” Groenendaal, Conductive and Magnetic Properties of 3,4-Dimethoxy- and 3,4-Ethylenedioxy-Capped Polypyrrole and Polythiophene *Chem. Mater.* 12 (2000) 2996–3005.
- [28] G. Zotti, S. Zecchin, G. Schiavon, B. Vercelli, A. Berlin, S. Grimoldi, Poly(N-hexyl-cyclopenta[c]pyrrole) – A Novel 1,3,4-Alkyl-substituted Polypyrrole Soluble in Organic Solvents and Redox Conducting, *Macromol. Chem. Phys.* 205 (2004) 2026–2031.

[29] Y. Zou, M. Wan, G. Sang, M. Ye, Y. Li, An alternative copolymer of carbazole and thieno[3,4b]-pyrazine: synthesis and mercury detection, *Adv. Funct. Mater.* 18 (2008) 2724–2732.

[30] J. Pohmer, M. V. Lakshmikantham, M. P. Cava, Synthesis of thieno[3,4-b] quinoxaline and derivatives, *J. Org. Chem.* 60 (1995) 8283–8288.

Figure Captions:

Figure 1 a) ^1H -NMR b) ^{13}C -NMR spectrum of BuDQP

Figure 2 Cyclic voltammograms and oxidation-reduction peak values of BuDQP in a) ACN
b) PC and c) DCM

Figure 3 Cyclic Voltammograms of the a) pure polypyrrole and b) P(BuDQP-*co*-Py)

Figure 4 Optoelectrochemical spectrum of P(BuDQP) film (a) 2D and (b) 3D

Figure 5 Optoelectrochemical spectrum of P(BuDQP-*co*-Py) film (a) 2D and (b) 3D

Figure 6 Redox colors of the a) P(BuDQP) and b) P(BuDQP-*co*-Py) film

Figure 7 Electrochromic switching, optical absorbance change monitored for a) P(BuDQP)
and b) P(BuDQP-*co*-Py)

Figure 8 Cyclic voltammograms of a) BuDQP and b) P(BuDQP-*co*-Py) at different scan rates. Inset figures show peak current vs scan rate graph for corresponding polymers.

Figure 9 Redox stability experiments of a) P(BuDQP) and b) P(BuDQP-*co*-Py) .

Table Captions:

Table 1 Electronic and electrochromic properties of the polymers

Scheme Captions:

Scheme 1. Synthetic route to the monomer BuDQP, conditions: (i) K_2CO_3 , ACN, reflux, 9 h, 85%; (ii) **1**, NaOEt (freshly prepared from Na(s) and EtOH under N_2 atmosphere), EtOH, 0°C , diethyl oxalate, 6 h, then treated with AcOH (pH~5), 75%; (iii) Br_2 , CHCl_3 , 45°C , 82%; (iv) EtOH, 0°C , 1 h, 82%; (v) K_2CO_3 , DMF, reflux, 6 h, 88%; (vi) KOH, EtOH, 5 h, 95%; (vii) triethanolamine, 130°C , 1 h, 65%.

Scheme 2 Electrochemical synthesis route for P(BuDQP) and P(BuDQP-*co*-Py)

Table 1. Electronic and electrochromic properties of the polymers

Polymer	Potential	Luminance (L)	Hue (a)	Saturation (b)
P(BuDQP)	-0.6 V	85	-4	21
	1.0 V	73	-2	-3
P(BuDQP- <i>co</i> -Py)	-1.0 V	77	-10	60
	-0.6 V	51	-5	33
	-0.2 V	37	7	4
	0.5 V	46	5	11
	0.7 V	43	-7	2
	1.0 V	39	-11	-4

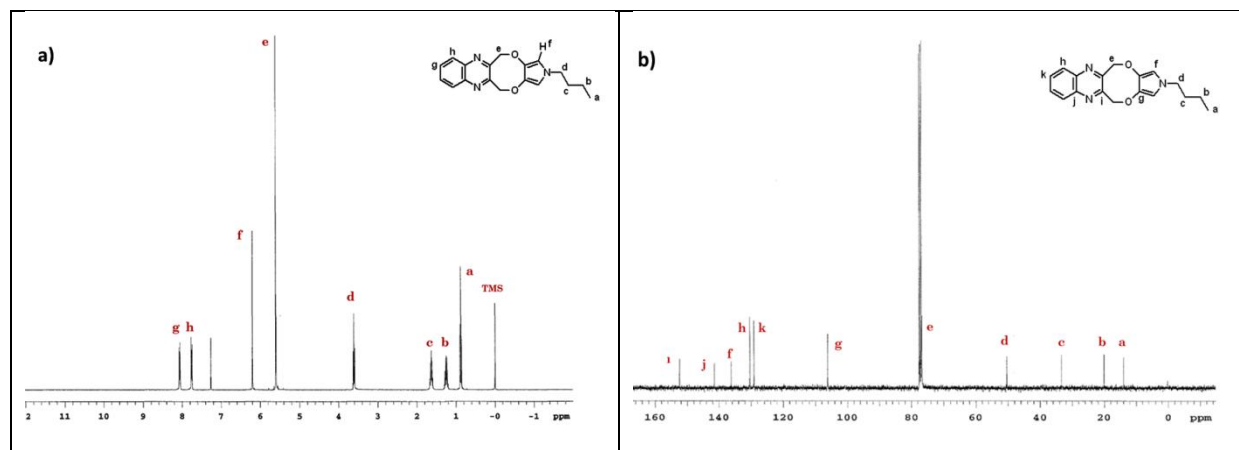


Figure 1. a) $^1\text{H-NMR}$ b) $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of BuDQP

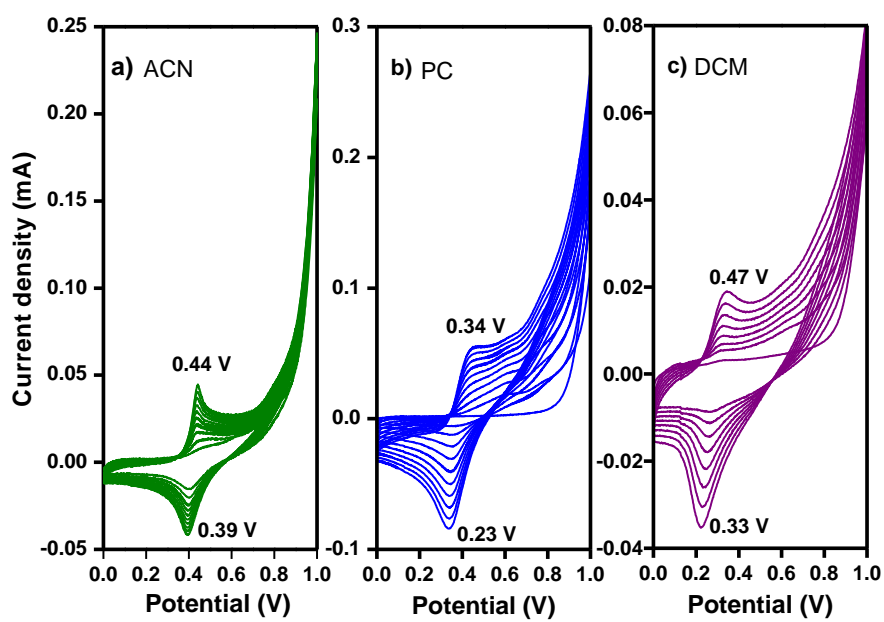


Figure 2 Cyclic voltammograms and oxidation-reduction peak values of BuDQP in a) ACN b) PC and c) DCM

Figure3

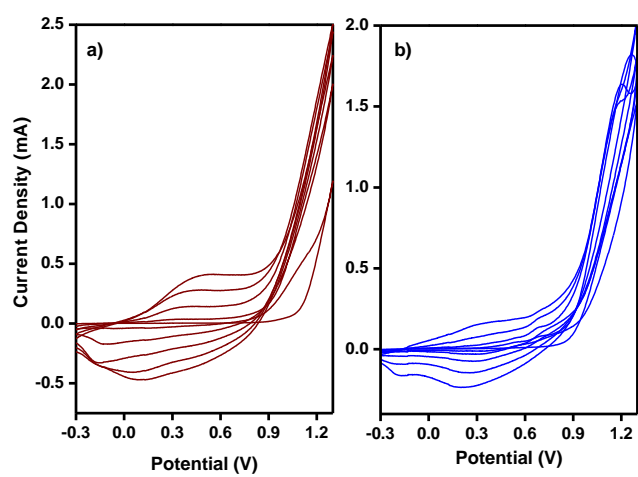


Figure 3. Cyclic Voltammograms of the a) pure polypyrrole and b) P(BuDQP-*co*-Py)

Figure 4

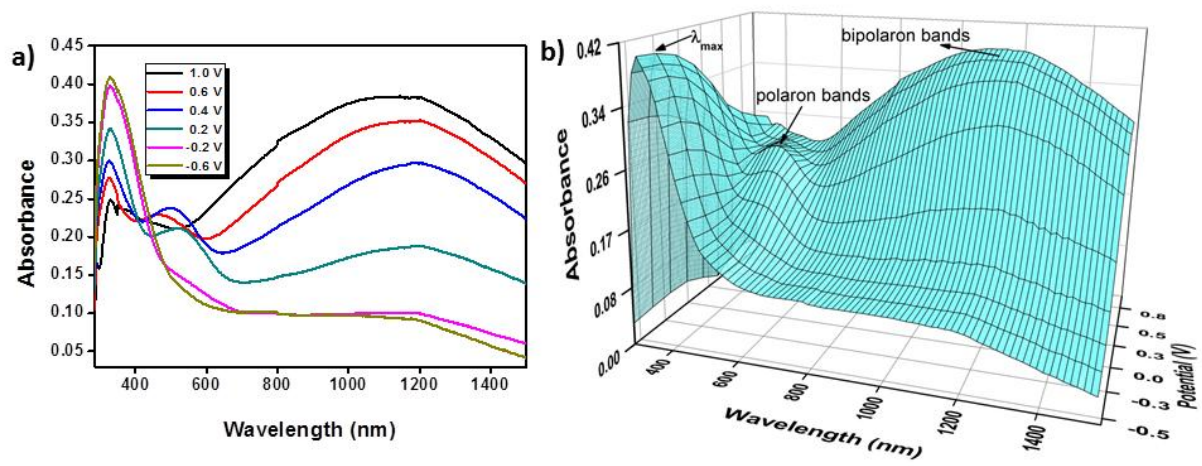


Figure 4 Optoelectrochemical spectrum of P(BuDQP) film (a) 2D and (b) 3D

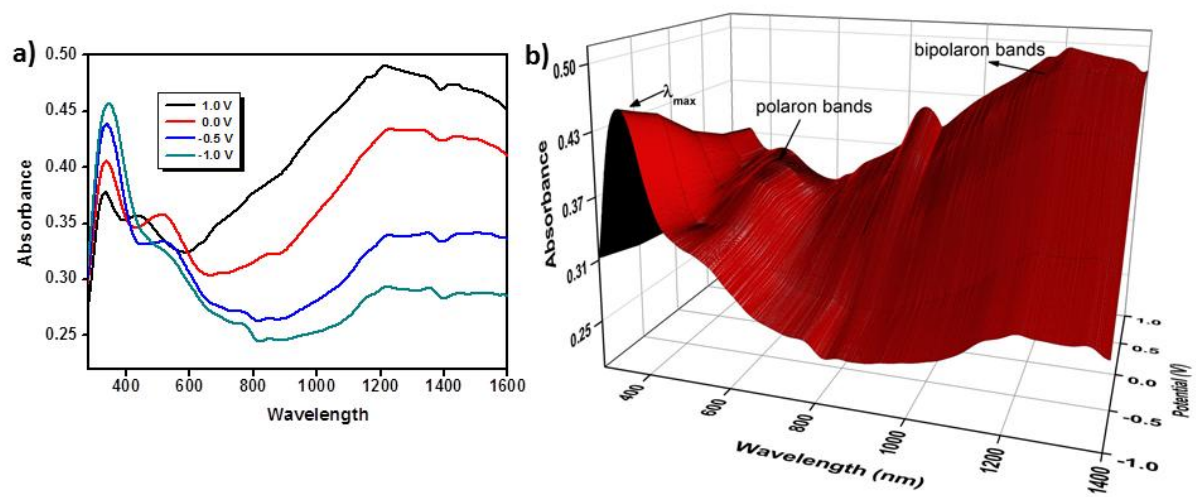


Figure 5 Optoelectrochemical spectrum of P(BuDQP-co-Py) film (a) 2D and (b) 3D

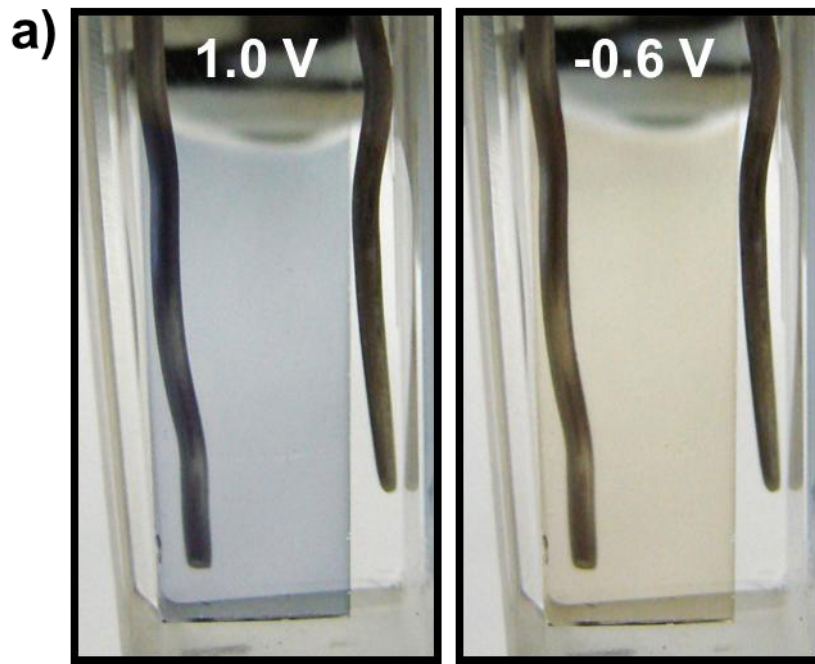


Figure 6a.

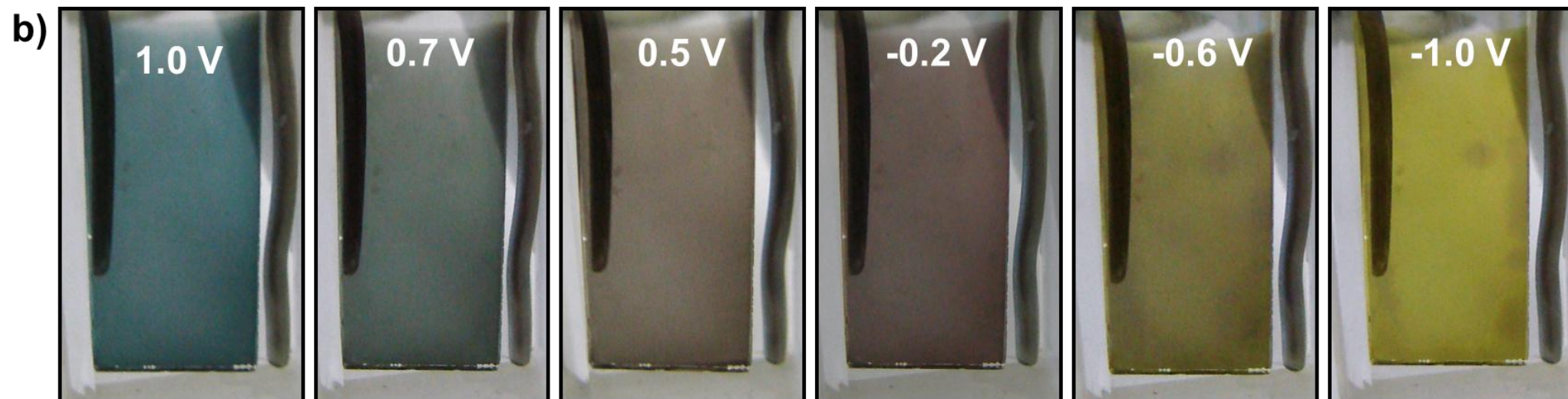


Figure 6b

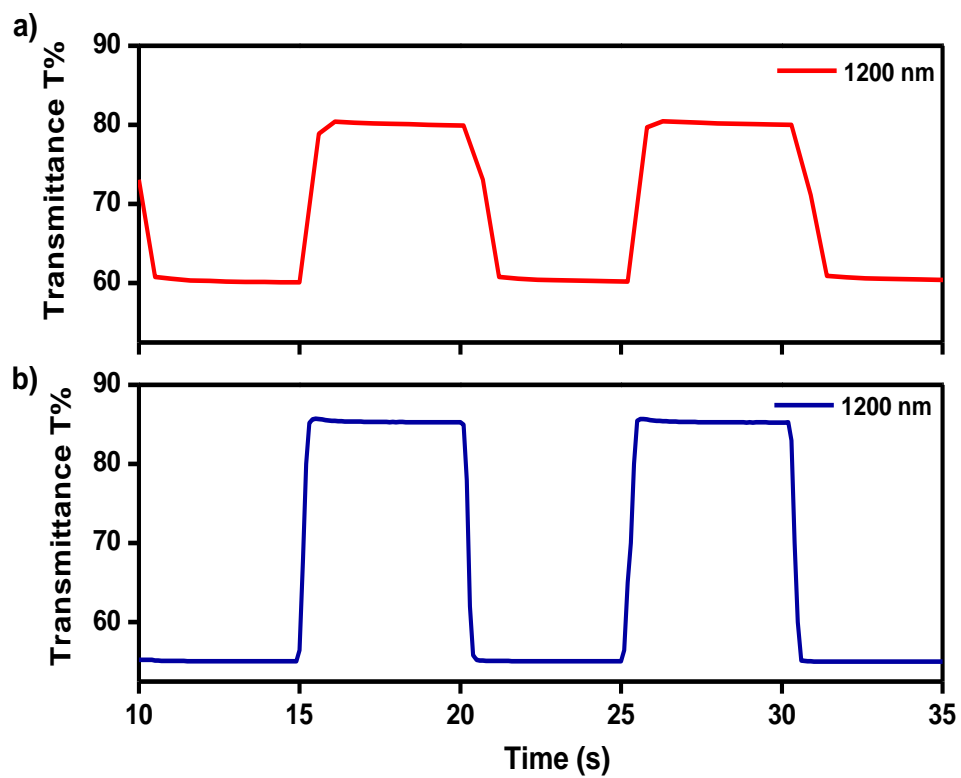


Figure 7. Electrochromic switching, optical absorbance change monitored for (a) BuDQP and (b) P(BuDQP-co-Py)

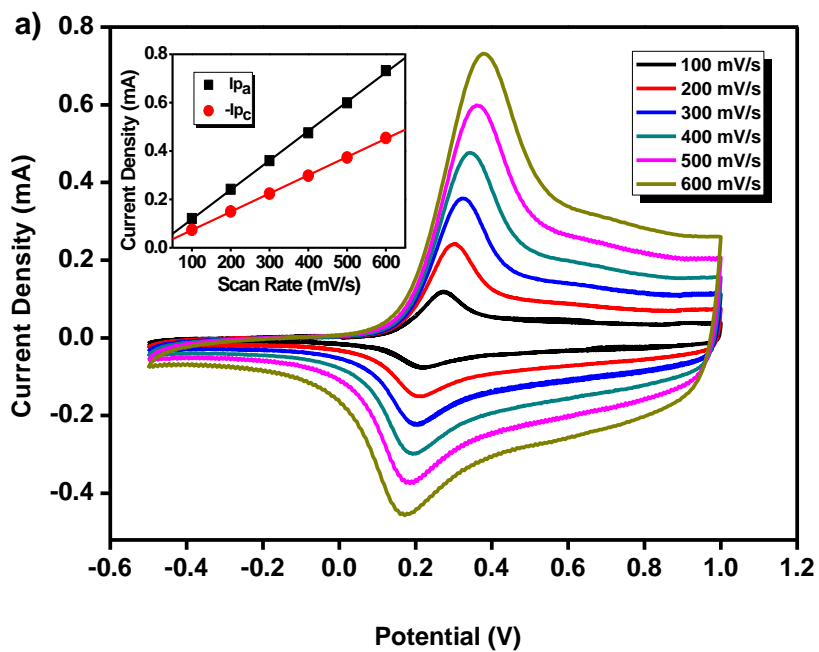


Figure 8a

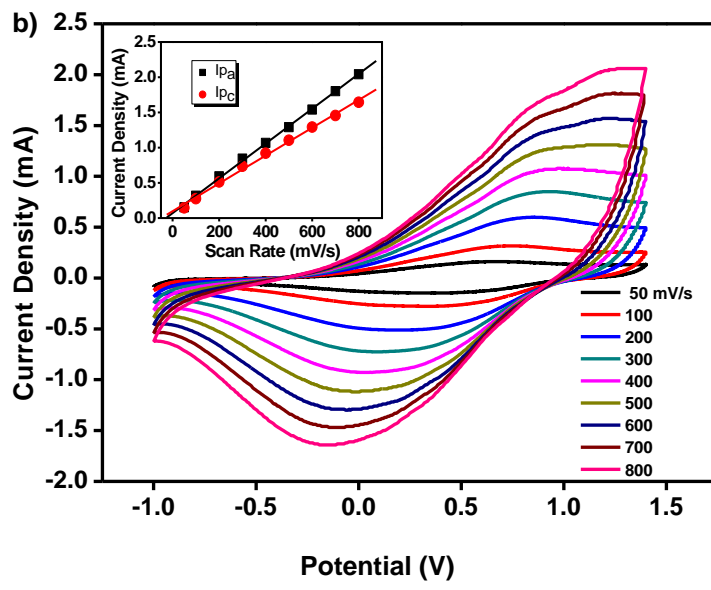


Figure 8b

Figure9a

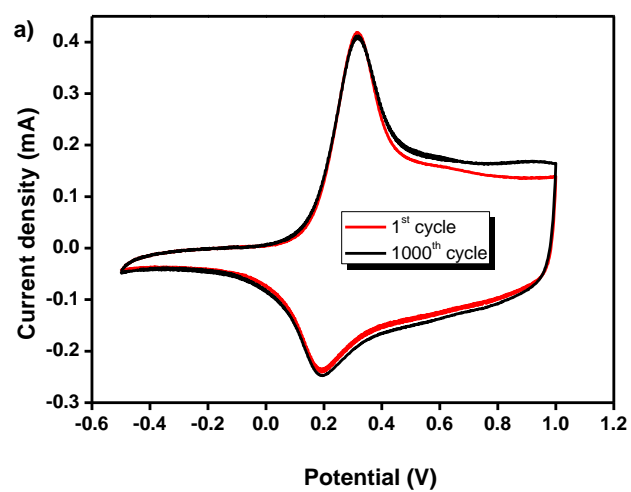


Figure 9a

Figure9b

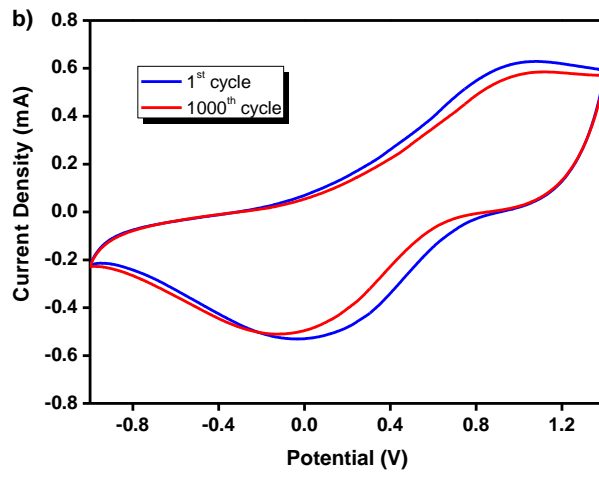
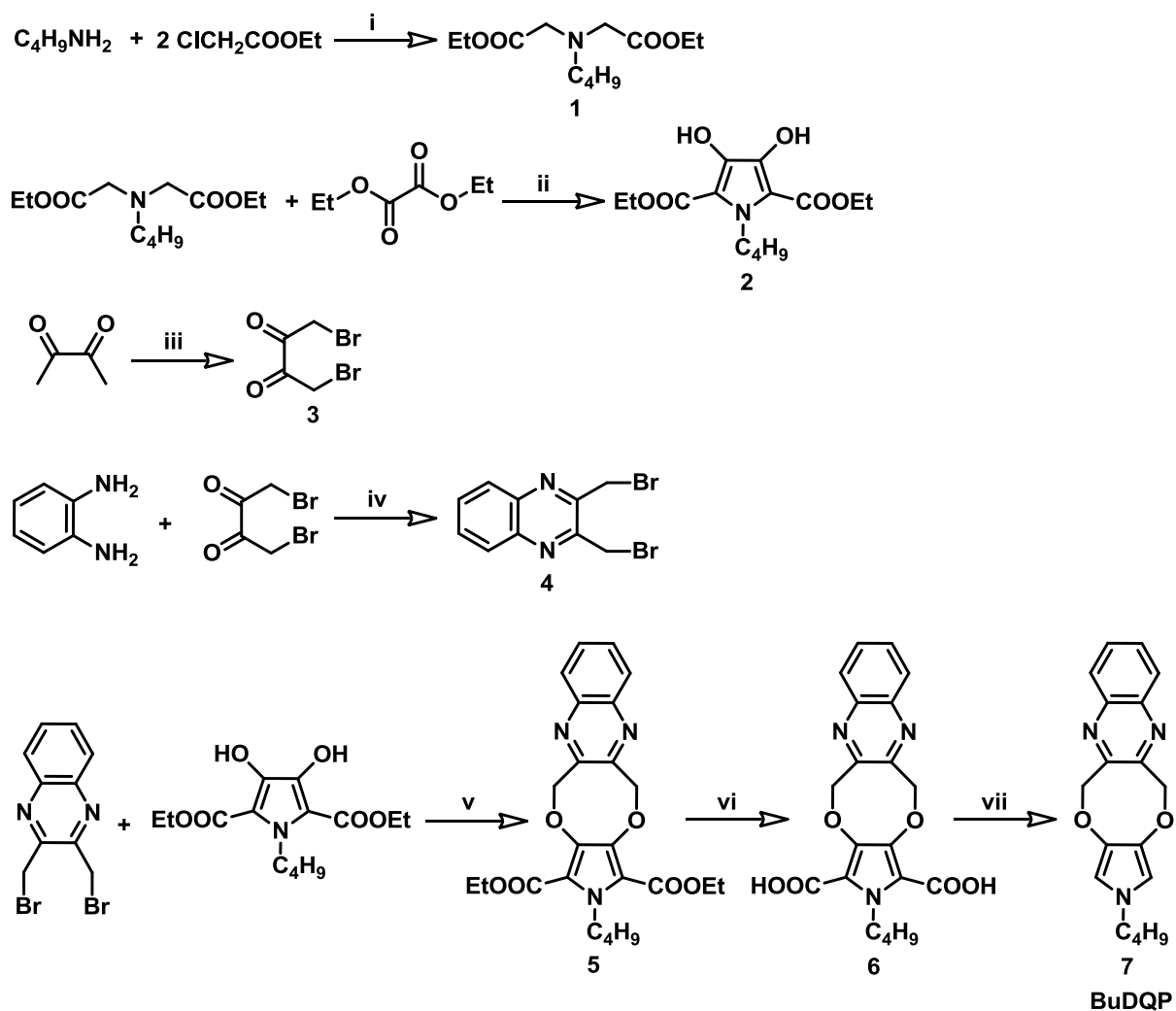
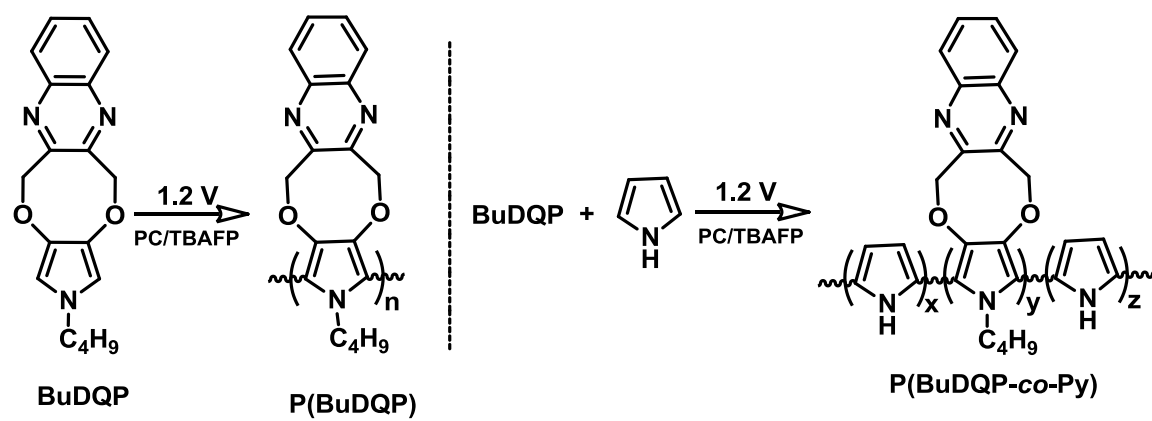


Figure 9b



Scheme 1. Synthetic route to the monomer BuDQP, conditions: (i) K_2CO_3 , ACN, reflux, 9 h, 85%; (ii) **1**, NaOEt (freshly prepared from Na(s) and EtOH under N_2 atmosphere), EtOH, $0^\circ C$, diethyl oxalate, 6 h, then treated with AcOH (pH~5), 75%; (iii) Br_2 , $CHCl_3$, $45^\circ C$, 82%; (iv) EtOH, $0^\circ C$, 1 h, 82%; (v) K_2CO_3 , DMF, reflux, 6 h, 88%; (vi) KOH, EtOH, 5 h, 95%; (vii) triethanolamine, $130^\circ C$, 1 h, 65%.



Scheme 2 Electrochemical synthesis route for P(BuDQP) and P(BuDQP-co-Py)

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. METİN AK
Proje No:	111T074
Proje Başlığı:	Organik-İnorganik Hibrit İletken Polimer Sentezi, Elektrokromik Ve Biyosensör Uygulamaları
Proje Türü:	Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	DİLEK ODACI DEMİRKOL, MEHMET KARAKUŞ
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. FEN-EDEBİYAT F. KİMYA B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/10/2011 - 01/10/2013
Onaylanan Bütçe:	223280.0
Harcanan Bütçe:	198399.81
Öz:	<p>İletken polimerler elektriksel etkilerle kimyasal, elektriksel, optik ve mekanik özelliklerinde değişime uğrarlar. İnorganik bileşenlerin iletken organik polimerler yapılarına dahil edilmesilmesiyle oluşturulan hibrit malzemeler biyoteknoloji, kataliz, elektronik gibi alanlarda umut verici uygulamalar vaatmektedir.</p> <p>Bu çalışmada, ferrosenilditiyadifosfetan ?ın amino ve hidroksil grubu içeren tiyofen ve pirol gibi elektroaktif bileşiklerle toluenli ortamda etkileştirilmesi sonucu yeni elektroaktif ditiyofosfor bileşikleri sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Hem organik hem de inorganik grup içeren bu monomerlerin uygun çözücü ve destek elektrolit varlığında elektrokimyasal olarak polimerleştirilmesiyle oluşturulan hibrit polimerlerin karakterizasyonu yapılarak, elektrokromik ve elektrokimyasal biyosensör uygulamaları araştırılmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	iletken polimer, elektrokromik, biyosensör, elektrokimya,
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	<p>1- Synthesis of ferrocene group contained conducting polymer and its electrochromic properties (Bildiri),</p> <p>2- Conducting Polymer of N-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)4-aminobenzamide as Platform for Microbial Biosensor Applications (Bildiri),</p> <p>3- Ferrosen içeren iletken polimer sentezi ve elektrokromik özelliklerinin incelenmesi (Bildiri),</p> <p>4- Ditiyofosfat ve ferrosen içeren iletken polimer sentezi ve EDOT ile kopolimer reaktivite oranlarının belirlenmesi (Bildiri),</p> <p>5- Ferrosenilditiyofosfat içeren iletken polimerin sentezi ve elektrokromik özellikleri (Bildiri),</p> <p>6- İletken Metallopolimer Sentezi ve Spektroelektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi (Bildiri),</p> <p>7- Ditiyofosfanat Ve Ferrosen İçeren İletken Polimerin Edot İle Kopolimer Reaktivite Oranlarının Belirlenmesi Ve Kopolimerin Spektroelektrokimyasal Özellikleri (Bildiri),</p> <p>8- İletken polimer oluşturabilecek elektroaktif monomer 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1h-pirol-1-yl)bütan-1-amin (hkcñ), bileşiği yapısının ve spektroskopik özelliklerinin hf ve dft kimyasal yöntemleriyle incelenmesi (Bildiri),</p> <p>9- Electropolymerization of a derivative of O-ferrocenyldithiophosphonates (Bildiri),</p> <p>10- Optical and electrochemical properties of a novel metallopolymer (Bildiri),</p> <p>1- A novel functional conducting polymer as an immobilization platform (Makale/Kitap/Kitapta Bölüm),</p> <p>2- Enzyme immobilization in a photosensitive conducting polymer bearing azobenzene in the main chain (Makale/Kitap/Kitapta Bölüm),</p> <p>3- Fabricating Multicolored Electrochromic Devices using Conducting Copolymers (Makale/Kitap/Kitapta Bölüm)</p>