

Kliklenmiş Yeni İletken Polimerin Glukoz Biyosensörü Olarak Kullanılması

Rukiye AYRANCI*

*Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Denizli

*Sorumlu Yazar
E-mail: rayranci@pau.edu.tr

Geliş Tarihi: 30.Ağustos.2018
Kabul Tarihi:05.Aralık.2018

Özet

İletken polimerler, termal, çevresel kararlılık, işlenebilirlik ve katkılındığında yüksek iletkenlik gibi üstün özelliklere sahiptir. Bu üstün özellikleri sayesinde iletken polimerler elektrokromik cihaz, güneş pili, sensör sistemleri gibi kullanım alanlarına sahiptir. Bu işlevsel organik yapılara özellikle molekülünün tasarım aşamasında bazı grupların dâhil edilmesiyle farklı amaçlara hitap etmek ya da elde edilecek ürünün özelliklerini geliştirmek oldukça heyecan verici olmuştur.

Bu kapsamda literatürde tiyenil pirol türevi olarak bilinen iletken monomer yapısı azido amit bileşiği ile fonksiyonlaştırılıp, propargil alkol ile bakır katalizöründe klik reaksiyonuna sokulmuştur. Klik reaksiyonu ile siklo katılmaya sahip olan SNS türevi biyomateryal oluşumuna potansiyel olmuştur. Elde edilen kliklenmiş SNS türevi grafit elektrot üzerinde polimerleştirilmiş, aktif enzim tutabilme yapısıyla yüzeyinde glukoz oksidaz enzimini tutuklayabilmiştir. Optimizasyon çalışmalarından sonra bu yeni biyomateryalin glukoz biyosensörü olabileceği incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İletken polimer, Glukoz biyosensörü, Elektropolimerizasyon, Amperometrik yöntem

Usage of Clicked New Conducting Polymer as Glucose Biosensor

Abstract

Conductive polymers have superior properties such as thermal, environmental stability, processability and high conductivity. Thanks to these superior properties, conductive polymers have applications such as electrochromic devices, solar cells, sensor systems. To appeal to different purposes or to improve the properties of the product to be obtained is very exciting when including some groups in the design phase of the molecule.

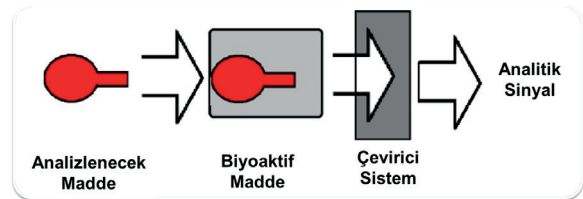
In this context, the conducting monomer structure known as thienyl pyrrole derivative (SNS) in the literature was functionalized with the azido amide and reacted with propargyl alcohol via click reaction with copper-catalyzed. The SNS possessing cyclo-addition with the click reaction had potential for the formation of biomaterials. The resulting clicked SNS was electropolimerized on graphite electrode and glucose oxidase enzyme was immobilized on active conducting polymer surface. After optimization studies, the ability to be a glucose biosensor of this new biomaterial has been examined.

Keywords: Conducting polymer, Glucose biosensor, Electropolimerization, Amperometric method

GİRİŞ

Diabet hastalığı, dünyada yaklaşık 200 milyon insanın maruz kaldığı bir hastalıktır. Bu hastalığın etkileri, kandaki glukozun sıkı bir takibi ile büyük oranda azaltılabilmektedir. Bu nedenle, milyonlarca diyabet hastası, kandaki glukoz miktarını günlük olarak ölçmek durumundadır. Bu durum glukozu, klinik teşhiste en yaygın test edilen analit yapmıştır [1].

Glukoz oksidaz enzimini temel alarak oluşturulan amperometrik enzim elektrotları, kan şekeri analizi için basit, kullanımı kolay sistemler arasında ön sıralarda gelmektedir ve glukozun devamlı izlenmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Amperometrik tayin ile ölçüm yapabilen bir biyosensörün en spesifik özelliği yüksek oranda immobilize edilen enzimin aktif merkezi ile uygun bir çalışma potansiyelinin uygulandığı bir elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferini gerçekleştirebilmesidir. Yani yüksek hassasiyet, hızlı tepki süresine sahip bir amperometrik biyosensör üretebilmenin ön koşulu, biyobileşen ile elektron arasında hızlı ve etkin bir elektron transferini sağlayabilmektir [2-9].



Şekil 1. Biyosensör Bileşenleri

Elektrokromik cam, güneş pili, yapay kas gibi çok çeşitli uygulama alanlarında kullanılan iletken polimerler son yıllarda glukoz biyosensörü çalışmalarında kullanılmaktadırlar [10-12,12-18]. Bu kapsamda iletken polimerler biyosensör sistemlerinde Şekil 1 de şematize edildiği gibi analizlenecek madde ile biyoaktif bileşenin arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali analitik bir sinyale çeviren dönüştürücü sistem olarak görev alırlar. İletken polimerlerin dönüştürücü olarak kullanıldığı amperometrik biyosensörlerde analit veya reaktantın, genellikle sabit potansiyel altında yükseltgenmesi ya da indirgenmesi sonucu oluşan akımı ölçülür. İşlevsel organik yapılara sahip olan iletken polimerlere özellikle molekülünün tasarım aşamasında bazı grupların dâhil edilmesiyle farklı amaçlara hitap edilerek elde edilen ürünün

özellikleri geliştirilebilmektedir. Yüksek verim, yan ürün eksikliği, fonksiyonel gruplara karşı yüksek tolerans ve basit ürün izolasyonu gibi avantajlara sahip olan klik reaksiyonları oda koşullarında çözücü duyarlılığı olmadan gerçekleşebilmektedir [19–21]. Klik reaksiyonlarının bu avantajlı sentez özellikleri iletken polimerlerin üstün özellikleriyle birleştirilerek elde edilecek yeni fonksiyonel iletken polimerler özellikle malzeme bilimi ve biyoteknoloji alanlarında kullanım alanı oluşturabilecektir.

Bu çalışmada literatürde tiyeni pirol türevi (SNS) olarak bilinen iletken monomer yapısı azido amit bileşiği ile fonksiyonlaştırılıp, propargil alkol ile bakır katalizöründe klik reaksiyonuna sokulmuştur. Klik reaksiyonu ile siklo katılmaya sahip olan SNS türevi biyomateryal oluşumuna potansiyel olmuştur. Elde edilen kliklenmiş SNS türevi grafit elektrot üzerinde dönüşümlü voltametri polimerleştirilmiştir. Yüzeyle oluşturulan iletken polimerin aktif enzim tutabilme özelliği sayesinde yüzey glukoz oksidaz enzimini aktif bir şekilde tutuklayabilmiştir. Bu şekilde iletken polimerle oluşturulan sensor platformu mikroskop görüntüleriyle karakterize edilmiştir. Hazırlanan sensör platformu glukoz varlığında oluşan elektron amperometrik olarak akım cevabına dönüşmüş ve dolayısıyla elde edilen platform biyosensör sisteminde dönüştürücü sistem olarak görev almıştır. Hazırlanan bu biyosensör platformu hızlı etkin ve tam donanımlı bir biyosensör uygulaması için ilk adımı oluşturmuştur.

MATERYAL VE YÖNTEM

Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Monomer sentezi için $AlCl_3$ (Merck), diklorometan (Merck), tiyofen (Merck), süksinil diklorür, hidroklorik asit ve sodyum bikarbonat (Aldrich), toluen, kullanılmıştır. Propargil alkol Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Elektrokimyasal polimerizasyon için çözücü olarak diklorometan (Merck), destek elektrolit olarak tetrabutil amonyum hegzaflofosfat (Aldrich) kullanılmıştır.

Biyosensör kısmında enzimlerin kendi aralarında kovalent bağlanması için çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan glutaraldehit (GA), (%25), D Glukoz, Glukoz oksidaz (Aspergillus niger. 200 U/mg) Sigma firmasından temin edilmiştir.

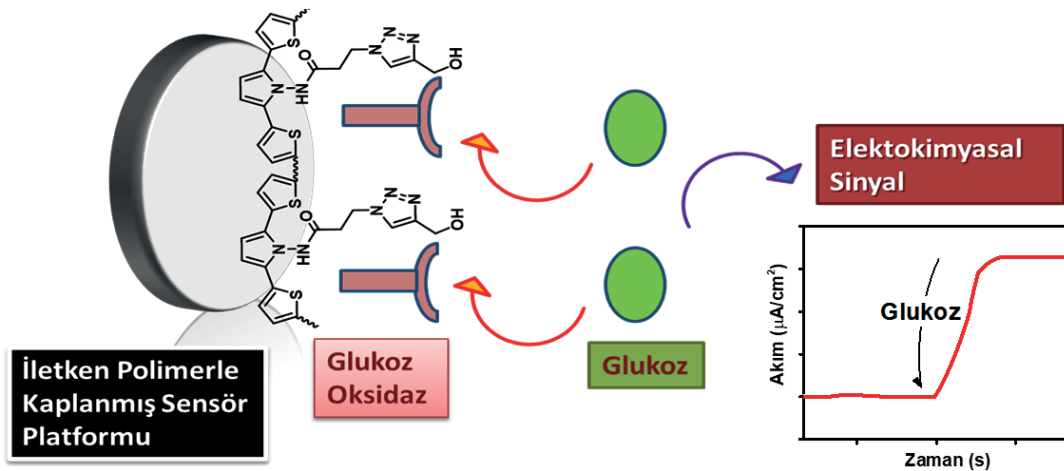
İletken polimerin sentezinde ve biyosensör uygulamasında Potansiyostat - Galvanostat Cihazına (Iviumstat) bağlı hücre ve üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Çalışma elektrodu olarak silindirik grafit elektrot, referans elektrodu olarak gümüş tel ve karşıt elektrot olarak da platin tel kullanılmıştır. Monomer karakterizasyonu için Perkin-Elmer FTIR-ATR cihazı kullanılmıştır.

Biyosensör Platformunda Kullanılan Monomerin Sentezi

Öncelikle literatürde tiyeni pirol türevi (SNS) olarak bilinen iletken monomer sentezlenmiştir. Sentezlenen bu yapı azido amit bileşiği ile fonksiyonlaştırılıp, propargil alkol ile bakır katalizöründe klik reaksiyonuna sokulmuştur. Sentezlenen monomer FTIR-ATR ile karakterize edilmiştir.

Biyosensör Platformunun Hazırlanması

Hazırlanan monomer grafit elektrot üzerinde dönüşümlü voltametri ile polimerleştirilerek yüzey polimer ile modifiye edilmiştir. Polimer yapısındaki siklo katılma ve $-NH$ grupları sayesinde polimer üzerine glukoz oksidaz enzimi glutaraldehit çapraz bağlayıcısı yardımıyla immobilize edilmiştir. Hazırlanan platformun bahsedilen her aşamasının mikroskop görüntüsü alınmış, yüzey karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan platform, 3 elektrotlu sistemde tampon çözelti içinde belirli glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Sensör platformundaki glukoz oksidaz enzimi glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono- δ -lakton (glukono-1,5-lakton) ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) oluştuğu reaksiyonu katalizler. Bu kataliz sonucu açığa çıkan elektron iletken polimer tarafından amperometrik olarak akım cevabına dönüşür. Bu sayede platform etkin bir şekilde glukoz tayinini gerçekleştirmektedir. Sensör platformunun şematik gösterimi Şekil 2' de verilmiştir.



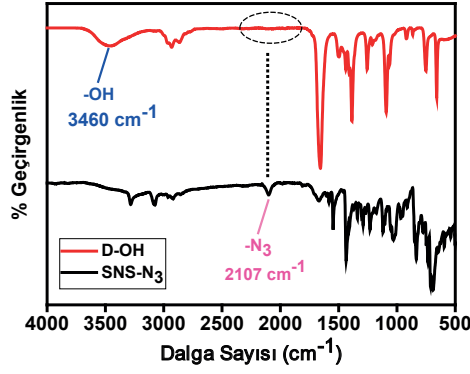
Şekil 2. Hazırlanan sensör platformunun amperometrik glukoz tayinini

BULGULAR VE TARTIŞMA

Monomerin FTIR Karakterizasyonu

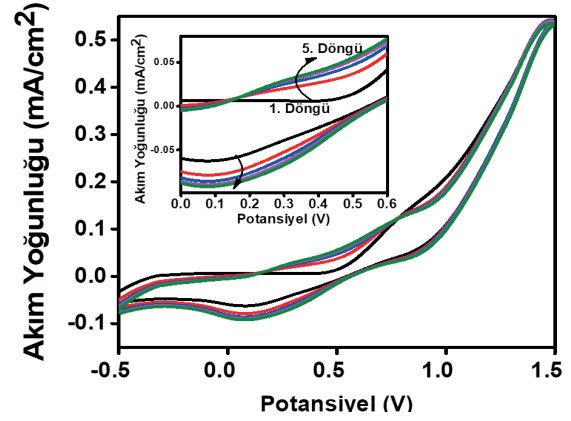
İlk olarak sentezlenen SNS monomeri yapı azido amit bileşiği ile fonksiyonlaştırılıp SNS azide dönüştürülmüştür. 2107 cm^{-1} de spesifik $-N_3$ piki gözlenmiştir [22,23]. Propargil alkol ile bakır katalizöründe klik reaksiyonuna sokulan

D-OH monomerinin FTIR spektrumu incelendiğinde 2107 cm^{-1} de gözlenen azid pikinin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Yine propargil alkol yapıya katıldığı da D-OH monomerinde 3460 cm^{-1} de gözlenen OH pikiyle kanıtlanmaktadır. SNS- N_3 bileşiğinin ve D-OH monomerinin karşılaştırmalı FTIR spektrumu Şekil 3' de gösterilmiştir.

Şekil 3. SNS-N₃ ve D-OH monomerinin FTIR spektrumu

Elektrokimyasal Polimerizasyon

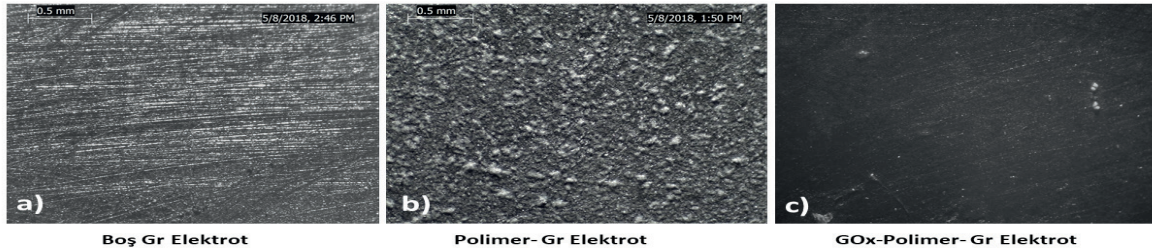
Temizlenerek hazır hale getirilen grafit elektrot üzerine D-OH monomeri -0.5 V-1.5 V aralığında 3 elektrotlu elektrokimya hücresinde dönüşümlü voltametri ile polimerleştirilmiştir. 0.5 V 'da gözlenen oksidasyon piki 0.1 V 'da gözlenen reduksiyon pikiyle ve ayrıca oluşan akım artışıyla monomerin elektrot yüzeyinde polimerleştirildiği kanıtlanmıştır. D-OH monomerinin dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 4' de gösterilmiştir.



Şekil 4. D-OH monomerinin dönüşümlü voltametri grafiği

Elektrot Karakterizasyonu

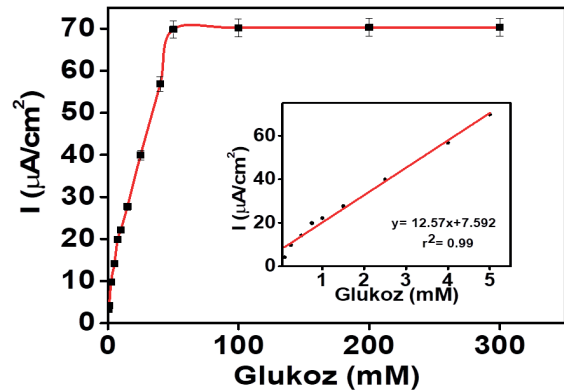
Hazırlanan biyosensör platformunun elektrot karakterizasyonunu gerçekleştirebilmek için öncelikle yüzeyi temizlenmiş boş grafit elektrodun mikroskop görüntüsü alınmıştır. Şekil 5. a' da grafit elektrodun çizikli yapısı dikkat çekmekteyken, Şekil 5. b' de polimer kaplı yüzeyin süngerimsi ve gözenekli yapısı yüzeyde polimerizasyon işleminin başarıyla gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Polimer yüzeyindeki aktif -NH gruplarının ve siklo katılma gruplarının etkisiyle glukoz oksidaz enzimi gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile yüzeye bağlanabilmiştir. Bu da Şekil 5.c'de gözlenen homojen ve pürüzsüz yüzeyden anlaşılabilir.



Şekil 5. a) Boş grafit b) Polimer- Grafit c) GOx-Polimer-Grafit elektrotlarının mikroskop görüntüleri

Glukoz Varlığında Biyosensör Uygulaması

Elektrot karakterizasyonundan sonra hazırlanan sensör platformu artan derişimlerde glukoz ilavelerine maruz bırakıldı ve sonuç amperometrik cevap akımları olarak kaydedilmiştir. Elde edilen akım farkı değerleri hesaplanarak Şekil. 6'da gözlendiği gibi grafiğe geçirilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi hazırlanan sensör platformu glukozu karşı duyarlıdır ve glukozun derişimi arttıkça cevap akımında artmaktadır. Belirlenen çalışma koşullarında, elde edilen cevaplar kalibrasyon grafiğini oluşturmuştur. 0,05-5,0 mM glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusallık gözlenmiştir.



Şekil 6. Sensör platformunun farklı glukoz konsantrasyonlarındaki akım cevabı

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, amaca yönelik özel olarak tasarlanmış monomerin grafit elektrot üzerinde elektrokimyasal polimerizasyonu ile oluşturulan polimer yüzeyi yapısındaki özel gruplar sayesinde glukoz oksidaz enzimini kolayca tutuklayabilmiştir. Bu sayede iletken polimer biyosensör sisteminin çevirici sistemini oluşturmuştur. Çevirici sistemde iletken polimer glukoz varlığında yapısındaki glukoz oksidazın katalizi sonucu oluşan elektroni akım cevabına dönüştürerek etkin ve hızlı biyosensör platformunu oluşturmuştur. Bu platform, klinik teşhiste en fazla kullanılan glukozun tam donanımlı tayini için ilk aşamayı oluşturmuştur.

Teşekkür

Bu makalede konu edilen çalışmanın gerçekleşmesinde destek sağlayan Pamukkale Üniversitesi Doktora Sonrası Araştırma Programı (DOSAP)'a teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- [1] Wang J 2008 In vivo glucose monitoring: Towards "Sense and Act" feedback-loop individualized medical systems *Talanta* **75** 636–41
- [2] Schuhmann W 2002 Amperometric enzyme biosensors based on optimised electron-transfer pathways and non-manual immobilisation procedures *Rev. Mol. Biotechnol.* **82** 425–41
- [3] Sadeghi S J 2013 *Amperometric Biosensors*
- [4] Hendry S P, Higgins I J and Bannister J V. 1990 Amperometric biosensors *J. Biotechnol.* **15** 229–38
- [5] Habermüller K, Mosbach M and Schuhmann W 2000 Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors *Fresenius. J. Anal. Chem.* **366** 560–8
- [6] Azak H, Guler E, Can U, Demirkol D O, Yildiz H B, Talaz O and Timur S 2013 Synthesis of an amine-functionalized naphthalene-containing conducting polymer as a matrix for biomolecule immobilization *RSC Adv.* **3** 19582
- [7] Guler E, Soyleyici H C, Demirkol D O, Ak M and Timur S 2014 A novel functional conducting polymer as an immobilization platform. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **40** 148–56
- [8] Amine A, Patriarche G J, Marrazza G and Mascini M 1991 Amperometric determination of glucose in undiluted food samples *Anal. Chim. Acta* **242** 91–8
- [9] Cui H F, Ye J S, Zhang W De, Li C M, Luong J H T and Sheu F S 2007 Selective and sensitive electrochemical detection of glucose in neutral solution using platinum-lead alloy nanoparticle/carbon nanotube nanocomposites *Anal. Chim. Acta* **594** 175–83
- [10] Ayrancı R and Ak M 2017 Synthesis of Rhodamine and Carbazole Based Conductive Polymer for Fluorescence and Electrochromic Applications *J. Electrochem. Soc.* **164** 509–14
- [11] Ayrancı R, Kirbay F O, Demirkol D O, AK M and Timur S 2018 Copolymer Based Multifunctional Conducting Polymer Film for Fluorescence Sensing of Glucose *Methods Appl. Fluoresc.*
- [12] Ayrancı R, Var E and Ak M 2017 Conjugated and Fluorescent Polymer Based on Dansyl-Substituted Carbazole: Investigation of Electrochromic and Ion Sensitivity Performance *ECS J. Solid State Sci. Technol.* **6** 211–6
- [13] Ayrancı R, Ak M, Ocal S and Karakus M 2016 Synthesis of new ferrocenyldithiophosphonate derivatives: electrochemical, electrochromic, and optical properties *Des.*

Monomers Polym. **5551** 1–8

[14] Oyman G, Geyik C, Ayrancı R, Ak M, Odacı Demirkol D, Timur S and Coskunol H 2014 Peptide-modified conducting polymer as a biofunctional surface: monitoring of cell adhesion and proliferation *RSC Adv.* **4** 53411–8

[15] Ayrancı R, Baskaya G, Guzel M, Bozkurt S, Ak M, Savk A and Sen F 2017 Enhanced optical and electrical properties of PEDOT via nanostructured carbon materials: A comparative investigation *Nano-Structures & Nano-Objects* **11** 13–9

[16] Oyman G, Geyik C, Ayrancı R, Ak M, Odacı Demirkol D, Timur S and Coskunol H 2014 Peptide Modified Conducting Polymer as Biofunctional Surface: Monitoring of Cell Adhesion and Proliferation *RSC Adv.*

[17] Ayrancı R, Demirkol D, Ak M and Timur S 2015 Ferrocene-Functionalized 4-(2,5-Di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)aniline: A Novel Design in Conducting Polymer-Based Electrochemical Biosensors *Sensors* **15** 1389–403

[18] Ayrancı R, Sogancı T, Guzel M, Demirkol D O, Ak M and Timur S 2015 Comparative investigation of spectroelectrochemical and biosensor application of two isomeric thienylpyrrole derivatives *RSC Adv.* **5** 52543–9

[19] Bräse S, Gil C, Knepper K, Zimmermann V, DE LA TORRE G G, Torres T, Agulló-López F, Deivanayagam P, Ramamoorthy A R, Deligöz H, Karakuş Ö Ö, Çilgi G K, Díaz-García M A, Agulló-López F, Torruellas W E, Stegeman G I, Dinçer H, Mert H, Şen B N, Dağ A, Bayraktar S, Dong H, Li F, Li J, Li Y, El-Sawy N, Elbarbary A M, FLOM S R, Giovanni B, David D, Tomás T, Guillaud G, Simon J, Germain J P, Huh M, Park Y S, Jung M, Kang S J, Kang T-B, Munam A, Gauthier M, Yun S II, Kimura M, Ueki H, Ohta K, Hanabusa K, Shirai H, Kobayashi N, Kolb H C, Finn M G, Sharpless K B, Konar B B, Saha M, Liang L, Astruc D, Liu B, Wang X, Yang B, Sun R, Liu Y, Chen W, Kim H-I, Nasongkla orased, Chen B, Macaraeg N, Fox E, Megan, Fréchet J, Jean M, Szoka Francis. C, Neil McKeown B, Peter Buddb M, RODRÍGUEZ-MORGAGE M S, DE LA TORRE G G, Torres T, Sakamoto K, Ohno E, Ohno-Okumura E, Tale N V, Jagtap R N, Tanriverdi S, Tuncagil S, Toppare L, Zilio C, Bernardi A, Palmioli A, Salina M, Tagliabue G, Buscaglia M, Consonni R and Chiari M 2012 Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions *J. Macromol. Sci. Part A* **49** 2004–21

[20] Kolb H C, Finn M G and Sharpless K B 2001 Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40** 2004–21

[21] Kolb H C, Finn M G and Sharpless K B 2001 Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions.pdf *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40** 2004–21

[22] Volet G, Lav T X, Babinot J and Amiel C 2011 Click-chemistry: An alternative way to functionalize poly(2-methyl-2-oxazoline) *Macromol. Chem. Phys.* **212** 118–24

[23] Cummins D, Duxbury C J, Quaedflieg P J L M, Magusin P C M M, Koning C E and Heise A 2009 Click chemistry as a means to functionalize macroporous PolyHIPE *Soft Matter* **5** 804–11