

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**İLETKEN POLİMER TABANLI AMPEROMETRİK BİYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ayhan ALTUN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİMYA
ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

OCAK 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**İLETKEN POLİMER TABANLI AMPEROMETRİK BİYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ayhan ALTUN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLETKEN POLİMER TABANLI AMPEROMETRİK BİYSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ

Ayhan ALTUN

KİMYA
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 25./01/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU (Danışman)

Prof. Dr. Erol AYRANCI

Prof. Dr. Ali ÇIRPAN

Prof. Dr. Metin AK

Doç. Dr. Önder TOPEL

ÖZET

İLETKEN POLİMER TABANLI AMPEROMETRİK BİYSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Ayhan ALTUN

Doktora Tezi / Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU

Ocak 2019; 133 Sayfa

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre, savunma sanayi ve birçok endüstriyel alanda özellikle otomasyon ve kalite kontrolünde çok önemli bir yere sahiptir. Özellikle glikoz, fenol türevleri ve üre gibi insan sağlığına olumsuz etkileri nedeni ile kontrol altında tutulması gereken bileşiklerin kolay, yüksek hassasiyetli analizine ihtiyaç duyulmaktadır. Biyosensörlerin yüksek spesifikliklerinin yanında, renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında doğrudan ölçmeye olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır. Literatürde iletken polimerlerin amperometrik biyosensörlerde kullanımı ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına karşın hazırlanan sensörlerin seçiciliği, duyarlılığı, ölçüm aralığı, kararlılığı, gözlenebilme sınırı ve raf ömrü gibi önemli özellikleri ticari, güncel uygulamalarda yer bulabilecek nitelikte olmadığından yeni biyosensörlerin üretimi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Son dönemde yapılan çalışmalar, gelişmiş özelliklere sahip biyosensörlerin hazırlanabilmesinin uygun niteliklere sahip yeni polimerler matrislerinin kullanılmasına bağlı olduğunu ortaya koymuştur.

Poli (2,5-ditiyeniilpirol) (PSNS) ve polipirol (PPy) türevleri düşük yükseltgenme potansiyeline sahip olmaları, kimyasal ve elektrokimyasal yöntemler ile kolayca sentezlenebilmeleri nedeniyle özellikle elektrokromik uygulamalar açısından umut verici niteliktedir. Tüm bu olumlu özelliklerine karşın, PSNS türevlerini içeren enzim biyosensör uygulamalarında polimer matrisi olarak kullanılması ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca, polimer yapısının biyosensörün özelliklerine etkileri sistematik olarak incelenmemiştir.

Tez kapsamında farklı yapıda beş SNS türevi (SNS-An, SNS-Et, SNS-N₃, SNS-HE ve SNS-Fc) ve Py-Fc monomerleri sentezlenmiştir. Söz konusu monomerler (SNS-N₃ ve Py-Fc hariç) elektrokimyasal olarak polimerleştirilmiş ve glikoz biyosensörlerinde elektro-aktif tabaka olarak kullanılmıştır. Kopolimerizasyonun etkisini incelemek amacı ile P(SNS-AN-ko-EDOT) elektrokimyasal yöntem ile sentezlenmiş ve glikoz biyosensörü hazırlanmıştır. Ayrıca, PSNS-Fc ve P(SNS-Fc-ko-EDOT) kullanılarak üre ve polifenol biyosensörleri de hazırlanmıştır. Söz konusu çalışmalarda biyosensör yapısında karbon nano metaryel kullanılması ve karbon nano metaryelin türünün etkisi de sistematik olarak incelenmiştir.

Hazırlanan toplam 21 farklı biyosensörün her biri için uygun hazırlanma ve çalışma koşulları belirlenmiştir. Daha sonra her bir biyosensörün analitik performansı duyarlılık, ölçüm aralığı, kararlılık, gözlenebilme sınırı, raf ömrü gibi özellikleri açısından kronoamperometrik yöntemle incelenmiştir. Hazırlanan biyosensörler, ticari olarak satılan ve /veya hastahane merkezi laboratuvarından temin edilen numunelerde glikoz, polifenol veya üre tayininde kullanılmış ve referans yöntem ile karşılaştırılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Amperometrik biyosensörler, Enzim, Glikoz, İletken polimerler, Polifenol, Üre

JÜRİ: Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU

Prof. Dr. Erol AYRANCI

Prof. Dr. Ali ÇIRPAN

Prof. Dr. Metin AK

Doç. Dr. Önder TOPEL

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AMPEROMETRIC BIOSENSORS BASED ON CONDUCTING POLYMER

Ayhan ALTUN

PhD. Thesis in CHEMISTRY

Supervisor: Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU

January 2019; 133 pages

Biosensors play a very important role in medicine, agriculture, food, pharmacy, environment, and many industries such as defense, automation, and quality control. Simple and highly sensitive analyses are needed for compounds, particularly glucose, phenol derivatives, and urea, which are needed to be kept under control due to their adverse effects on human health. In addition to their high specificity, biosensors have other advantages such as the possibility of direct measurement in colored or cloudy solutions in a wide concentration range. Even though there are many studies in literature about the use of conductive polymers in amperometric biosensors, intensive studies have been carried out for the production of new biosensors since the important characteristics of the existing sensors such as selectivity, sensitivity, linear range, stability, detection limit, and shelf life are not good enough for current commercial applications. Recent studies have shown that designing biosensors with advanced properties involves use of new polymer matrices with appropriate characteristics.

Poly (2,5-dithienylpyrrole) (PSNS) and polypyrrole (PPy) derivatives are promising, especially for electrochromic applications, as they have low oxidation potentials and can be easily synthesized by chemical and electrochemical methods. Despite these favorable properties, there is a limited number of studies on the use of PSNS derivatives as polymer matrices in enzyme biosensor applications. Additionally, the effects of the polymer structure on the biosensor characteristics have not been investigated systematically.

For this thesis, we have synthesized Py-Fc and five different SNS derivatives (SNS-An, SNS-Et, SNS-N₃, SNS-HE, and SNS-Fc). These monomers (except PSNS-N₃ and PPy-Fc) were polymerized electrochemically and used as the electroactive layer in glucose biosensors. To investigate the effect of copolymerization, we electrochemically synthesized P(SNS-AN-co-EDOT) and utilized in a glucose biosensor. We also prepared urea and polyphenol biosensors by using PSNS-Fc and P(SNS-Fc-co-EDOT). The use of accelerators in the biosensor structure and the effect of the accelerator type were also investigated systematically in our studies.

The appropriate preparation and working conditions were determined for each of the 21 different biosensors. Then, using chronoamperometry, the analytical performance of each biosensor was examined in terms of their analytical characteristics such as

sensitivity, liner range, stability, lowest detection limit, and shelf life. Prepared biosensors were used for glucose, polyphenol, or urea detection in commercially available samples and/or samples obtained from a hospital central laboratory and the results were compared with the reference method.

KEYWORDS: Amperometric biosensors, Conducting polymers, Enzyme, Glucose, Polyphenol, Urea.

COMMITTEE: Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU

Prof. Dr. Erol AYRANCI

Prof. Dr. Ali ÇIRPAN

Prof. Dr. Metin AK

Assoc. Prof. Dr. Önder TOPEL

ÖNSÖZ

Biyosensörler insan hayatını olumsuz etkileyen bileşiklerin çok az miktarda madde ile hızlı analizini sağlamaktadır. Yapılan bu çalışma ile glikoz, fenol türevleri ve üre gibi insan sağlığına olumsuz etkileri nedeni ile kontrol altında tutulması gereken bileşiklerin kolay, yüksek hassasiyetli bir yöntem ile analizine olanak sağlanması hedeflenmiştir. Bu noktada kullanılması planlanan PSNS ve PPy türevi iletken polimer matrisler hedefe yönelik tasarlanmış olup, polimer yapısı, kopolimerizasyon, medyatör kullanımı, karbon nano materyal türü ve takip edilen bileşen ile biyosensör özellikleri arasındaki ilişki incelenmiştir.

Doktora eğitimim boyunca engin bilgisi, tecrübesi ile sabırla bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU'ya teşekkürlerimi sunarım. Çalışma arkadaşım Neşe GÜVEN'e monomerlerin sentezindeki yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Tez izleme komitesinde olup bana yardımcı olan sayın hocalarım Prof. Dr. Erol AYRANCI ve Prof. Dr. Metin AK'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatımda olduğu gibi doktora eğitimim boyunca yanımda olan aileme, yoğun çalışma şartlarında gösterdiği üstün sabır ve desteğinden dolayı sevgili eşim Gözde ALTUN'a tüm benliğimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	vi
AKADEMİK BEYAN	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiv
1. GİRİŞ	1
1.1. İletken Polimerler	1
1.1.1. İletken polimerlerin sentez yöntemleri	2
1.1.1.1. Kimyasal yöntem	2
1.1.1.2. Elektrokimyasal yöntem	2
1.1.2. Poli (2,5-ditiyeniilpirol) (PSNS) Türevleri	4
1.2. Biyosensörler	8
1.2.1. Biyosensörlerin Tarihi	8
1.2.2. Biyosensörlerin yapısı	9
1.2.2.1. Biyobileşenler	10
1.2.2.2. Fiziksel bileşenler	10
1.2.3. Biyosensör türleri	10
1.2.3.1. Optik biyosensörler	10
1.2.3.2. Piezoelektrik biyosensörler (QCM)	10
1.2.3.3. Termal biyosensörler	11
1.2.3.4. Elektrokimyasal biyosensörler	11
1.2.3.4a. Potansiyometrik biyosensörler	11
1.2.3.4b. Konduktometrik biyosensörler	11
1.2.3.4c. Amperometrik biyosensörler	11
1.2.4. Amperometrik biyosensörlerin analitik performanların değerlendirilmesi ..	12
1.2.4.1. Doğrusallık ve tayin aralığı	12
1.2.4.2. Gözlenebilme sınırı (LOD)	13

1.2.4.3. Duyarlılık	13
1.2.4.4. Kullanım kararlılığı	13
1.2.4.5. Seçicilik	13
1.2.4.6. Raf ömrü	14
1.2.5. Amperometrik biyosensörlerin avantaj ve dezavantajları	14
1.3. Enzimler	15
1.3.1. Glikoz oksidaz (GOX) enzimi	15
1.3.2. Üreaz enzimi	16
1.3.3. Polifenol oksidaz (PPO) enzimi	17
1.3.4. Enzim kinetiği	17
1.3.5. Enzim immobilizasyon yöntemleri	19
1.3.5.1. Adsorpsiyon yöntemi	20
1.3.5.2. Tutuklama (Hapsetme) yöntemi	21
1.3.5.3. İyonik bağlama yöntemi	21
1.3.5.4. Kovalent bağlama yöntemi	21
1.3.5.5. Çapraz bağlama yöntemi	21
2. KAYNAK TARAMASI	22
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Kullanılan Kimyasallar	25
3.2. Kullanılan Çözeltiler	25
3.3. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	26
3.4. Hücre ve Elektrotlar	27
3.5. Platin Levhaların Temizlenmesi	27
3.6. Tarama Hızı Çalışması	27
3.7. SNS Türevlerinin Sentezi	27
3.7.1. 1,4-di-tiyofen-2-il-bütan-1,4-dion sentezi	27
3.7.2. Paal-Knorr tepkimesi ile SNS türevlerinin sentezi	28
3.7.3. 1-(2-azido-etil)-2,5-di-tiyofen-2-il-H-pirol sentezi (SNS-N ₃) sentezi	28
3.7.4. SNS-Fc sentezi	29
3.7.5. 4-ferrosenil-1-(4-pirol-1-il-bütül)-1H-[1,2,3]triazol (Py-Fc) sentezi	29
3.8. İletken Polimerin Sentezi	30

3.9. P(SNS-An) Sentezi	30
3.10. P(SNS-Fc), P(SNS-Et), P(SNS-HE) Homopolimerlerinin Sentezi	30
3.11. P(SNS-N ₃) Sentezi	31
3.12. P(Py-Fc) Sentezi	31
3.13. P(SNS-An –ko- EDOT) Kopolimerinin Sentezi.....	31
3.14. P(SNS-Fc-ko-EDOT) Kopolimerinin Sentezi	31
3.15. Biyosensörlerin Hazırlanması	31
3.16. Ölçüm Tekniği	32
3.17. Çalışma Parametrelerin Belirlenmesi	33
3.17.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi.....	33
3.17.2. Enzim miktarı ve glutraldehit miktarı etkisi.....	33
3.17.3. Karbon nanotüp (CNT) etkisi.....	34
3.17.4. Fulleren (C ₆₀) etkisi.....	34
3.18. Biyosensörlerin Analitik Performanslarının Değerlendirilmesi	34
3.18.1. Substrat derişiminin etkisi	34
3.18.2. Gözlenebilme sınırı (LOD)	34
3.18.3. Enzim elektrotların kullanım kararlılığı	35
3.18.4. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi	35
3.18.5. Girişim etkisinin incelenmesi	35
3.18.6. Gerçek numune analizi.....	35
4. BULGULAR	36
4.1. P(SNS-An) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular.....	37
4.1.1. P(SNS-An) sentezi	37
4.1.2. Biyosensörünün analitik performansının hidrojenperoksit ölçümüne bağlı olarak incelenmesi.....	38
4.1.2.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi.....	38
4.1.2.2. Kronoamperometrik bulgular	38
4.1.2.3. Raf ömrü.....	39
4.1.3. Biyosensörünün analitik performansının oksijen ölçümüne bağlı olarak incelenmesi	40
4.1.3.1. Kronoamperometrik bulgular.....	40

4.1.3.2. Raf ömrü.....	40
4.2. P(SNS-An –ko- EDOT) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular.....	42
4.2.1. P(SNS-An –ko- EDOT) sentezi	42
4.2.2. P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörü ile ilgili bulgular	42
4.2.2.1. Biyosensörün analitik performansının hidrojenperoksit ölçümüne bağlı olarak incelenmesi.....	42
4.2.2.1a. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi	42
4.2.2.1b. Kronoamperometrik bulgular	44
4.2.2.1c. Kullanım kararlılığı	45
4.2.2.2. Biyosensörün analitik performansının oksijene bağlı olarak incelenmesi.....	46
4.2.2.2a. Kronoamperometrik bulgular	46
4.2.2.2b. Kullanım kararlılığı.....	46
4.2.2.2c. Raf ömrü.....	47
4.2.3. P(SNS-An –ko- EDOT)/C ₆₀ /GOX biyosensörü ile ilgili bulgular.....	47
4.2.3.1. Biyosensörün analitik performansının hidrojenperoksit ölçümüne bağlı olarak incelenmesi.....	48
4.2.3.1a. Kronoamperometrik bulgular	48
4.2.3.1b. Raf ömrü.....	48
4.2.3.2. Biyosensörün analitik performansının oksijen ölçümüne bağlı olarak incelenmesi.....	49
4.2.3.2a. Kronoamperometrik bulgular	49
4.2.3.2b. Raf ömrü.....	49
4.2.4. P(SNS-An) ve P(SNS-An –ko- EDOT) biyosensörlerinde girişim etkisi ve gerçek numune analizleri ile ilgili bulgular.....	51
4.3. P(SNS-Et) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular	53
4.3.1. P(SNS-Et) sentezi	53
4.3.2. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi.....	54
4.3.2.1. pH etkisi	54
4.3.2.2. Enzim ve glutraldehit miktarı etkisi	55
4.3.3. Kronoamperometrik bulgular.....	55
4.3.4. Kullanım kararlılığı.....	57

4.3.5. Girişim etkisi ve gerçek numune analizi ile ilgili bulgular	57
4.3.6. Raf ömrü	58
4.4. P(SNS-HE) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular	59
4.4.1. P(SNS-HE) sentezi.....	59
4.4.2. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi.....	60
4.4.2.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi.....	60
4.4.2.2. Enzim ve glutraldehit miktarı etkisi	61
4.4.2.3. CNT miktarı etkisi.....	61
4.4.3. Biyosensörün analitik performansının hidrojenperoksit ölçümüne bağlı olarak incelenmesi	62
4.4.3.1. Kronoamperometrik bulgular	62
4.4.3.2. Kullanım kararlılığı	62
4.4.3.3. Raf ömrü.....	64
4.4.4. Biyosensörün analitik performansının oksijen ölçümüne bağlı olarak incelenmesi	64
4.4.4.1. Kronoamperometrik bulgular	64
4.4.4.2. Kullanım kararlılığı	64
4.4.4.3. Raf ömrü.....	66
4.4.5. Girişim etkisi ve gerçek numune analizi ile ilgili bulgular	66
4.5. P(SNS-Fc) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular	68
4.5.1. P(SNS-Fc) sentezi	68
4.5.2. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi.....	69
4.5.2.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi.....	69
4.5.2.2. CNT miktarı etkisi.....	70
4.5.2.3. Enzim ve glutraldehit miktarı etkisi	70
4.5.3. P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kronoamperometrik bulguları	72
4.5.4. P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kullanım kararlılığı	72
4.5.5. P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kronoamperometrik bulguları	73
4.5.6. P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kullanım kararlılığı	73
4.5.7. P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki raf ömrü	73

4.5.8. P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kronoamperometrik bulguları	75
4.5.9. P(SNS-Fc)CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kullanım kararlılığı.....	75
4.5.10. P(SNS-Fc)CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kronoamperometrik bulguları	77
4.5.11. P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kullanım kararlılığı.....	77
4.5.12. P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki raf ömrü.....	78
4.5.13. Girişim etkisi ile ilgili bulgular	78
4.5.14. Gerçek numune analizi ile ilgili bulgular.....	79
4.6. P(SNS-Fc -ko- EDOT) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular	81
4.6.1. P(SNS-Fc -ko- EDOT) sentezi.....	81
4.6.2. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi.....	82
4.6.2.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi.....	82
4.6.2.2. CNT etkisi	82
4.6.2.3. Enzim miktarı ve glüteraldehit miktarı etkisi.....	83
4.6.3. P(SNS-Fc -ko- EDOT)GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kronoamperometrik bulguları	84
4.6.4. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kullanım kararlılığı.....	84
4.6.5. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kronoamperometrik bulguları	86
4.6.6. P(SNS-Fc – ko- EDOT)/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kullanım kararlılığı.....	86
4.6.7. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki raf ömrü.....	87
4.6.8. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kronoamperometrik bulguları	88
4.6.9. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kullanım kararlılığı.....	89
4.6.10. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kronoamperometrik bulguları	89
4.6.11. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kullanım kararlılığı.....	90
4.6.12. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki raf ömrü .	90

4.6.13. Girişim etkisi ile ilgili bulgular	91
4.6.14. Gerçek numune analizi ile ilgili bulgular	93
4.7. P(SNS-Fc –ko- EDOT) Tabanlı Üre Biyosensörleri ile ilgili Bulgular	94
4.7.1. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi	94
4.7.1.1. Potansiyel ve pH çalışması	94
4.7.1.2. Enzim miktarı ve glüteraldehit miktarı etkisi	94
4.7.2. Kronoamperometrik bulguları	95
4.7.3. Biyosensörün kullanım kararlılığı	96
4.7.4. Biyosensörün raf ömrü	96
4.8. P(SNS-Fc) Tabanlı Üre Biyosensörleri ile ilgili Bulgular	98
4.8.1. Kronoamperometrik bulgular	98
4.8.2. Kullanım kararlılığı	98
4.8.3. Girişim etkisi ile ilgili bulgular	99
4.8.4. Gerçek numune analizi ile bulgular	100
4.9. P(SNS-Fc) Tabanlı Polifenol Biyosensörleri ile ilgili Bulgular	101
4.9.1. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi	101
4.9.1.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi	101
4.9.1.2. Enzim ve glüteraldehit etkisi	101
4.9.2. Kronoamperometrik bulgular	102
4.10. P(SNS-Fc -ko- EDOT) Tabanlı Polifenol Biyosensörü ile ilgili bulgular	104
4.10.1. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi	104
4.10.1.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi	104
4.10.1.2. Enzim ve glüteraldehit etkisi	104
4.10.2. Kronoamperometrik bulgular	105
5. TARTIŞMA	107
5.1. Glikoz Biyosensörleri	107
5.2. Üre Biyosensörleri	113
5.3. Polifenol Biyosensörleri	114
6. SONUÇLAR	116
7. KAYNAKLAR	118
8. EKLER	127

8.1. GCE ve Pt Disk Çalışmaları	127
8.2. Pt/P(SNS-An-ko-EDOT)/CNT Biyosensörü için Hidrojenperoksitin Substrat Olarak Kullanıldığı Çalışmalar	128
8.3. SEM Görüntüleri	130

ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “İletken Polimer Tabanlı Amperometrik Biyosensörlerin Geliştirilmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

25/01/2019

Ayhan ALTUN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C	: Derişim
eV	: Elektron Volt
I	: Akım
I_{max}	: Maksimum akım
ΔI	: Akım değişimi
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
M	: Milli
M	: Molarite
S	: Saniye
S/N	: Sinyal/gürültü
s/m	: Standart sapma/eğim
U	: Ünite
V	: Volt
μ	: Mikro

Kısaltmalar

AA	: Askorbik asit
ACN	: Asetonitril
C	: Kimyasal
C_{60}	: Fulleren
CNT	: Çok duvarlı karbon nanotüp
CP	: İletken polimer
CV	: Dönüşümlü Voltametri
C_v	: Varyasyon katsayısı
DCM	: Diklorometan
E	: Elektrokimyasal
EDOT	: 3,4-etilendioksitiyofen
GA	: Gluteraldehit
GCE	: Camsı karbon elektrot
GOX	: Glikoz Oksidaz
ITO	: İndiyum tinoksit elektrot
LB	: Linewear-Burk
LOD	: Gözlenebilme sınırı
PEDOT	: Poli(3,4-etilendioksitiyofen)
PPy	: Polipirol
PSNS	: Poli(2,5-ditiyenilpirol)
P(SNS-An -ko-EDOT)	: Poli(4-(2,5-di(tiyofenil-2-yl)-1H-pirol-1-l) benzenamin – ko- 3,4-etilendioksitiyofen)

P(SNS-Et)	: Poli(2-(2,5-di-tiyofen-2-il-pirol-1-il)-etanol)
P(SNS-Fc)	: Poli((4-ferrosenil-1-[2-(2,5-di-tiyofen-2-il-pirol-1-il)-etil]-1H-[1,2,3]triazol))
P(Py-Fc)	: Poli(4-ferrosenil-1-(4-pirol-1-il-bütül)-1H-[1,2,3]triazol)
P(SNS-HE)	: Poli(1-(2-etil-hegzil)-2,5-di-tiyofen-2-il-2,3-dihidro-1H-pirol)
P(SNBS)	: Poli(1-benzil-2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol)
P(SNS-N ₃)	: Poli(1-(2-azido-etil)-2,5-di-tiyofen-2-il-H-pirol)
PPO	: Polifenol oksidaz
Pt	: Platin
Py-Fc	: 4-ferrosenil-1-(4-pirol-1-il-bütül)-1H-[1,2,3]triazol
SA	: Sitrik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu
SNS	: 2,5-ditiyenilpirol
SNS-An	: 4-(2,5-di(tiyofenil-2-yl)-1H-pirol-1-l) benzenamin
SNS-Et	: 2-(2,5-di-tiyofen-2-il-pirol-1-il)-etanol
SNS-Fc	: (4-ferrosenil-1-[2-(2,5-di-tiyofen-2-il-pirol-1-il)-etil]-1H-[1,2,3]triazol)
SNS-HE	: 1-(2-etil-hegzil)-2,5-di-tiyofen-2-il-2,3-dihidro-1H-pirol
SNS-N ₃	: 1-(2-azido-etil)-2,5-di-tiyofen-2-il-H-pirol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İletken polimerler: a) Poliasetilen; b) Polipirol; c) Politiyofen; d) Polianilin.	2
Şekil 1.2. Elektropolimerizasyon sırasında gerçekleşen ECE mekanizması	4
Şekil 1.3. Bazı SNS tabanlı iletken polimerler.	5
Şekil 1.4. SNS-An'ın EDOT ile kopolimerlerine ait renkler	6
Şekil 1.5. P(SNS-HE) ve P(SNS-HE-co-EDOT) polimerlerinin yapıları.	6
Şekil 1.6. P(SNS-Fc) ve P(SNS-Fc –co- EDOT) polimerlerinin yapıları.	7
Şekil 1.7. Analit, biyobileşen, fiziksel bileşen ve ölçüm cihazı gibi bileşenleri olan biyosensörlerin şematik gösterimi.	8
Şekil 1.8. YSI firmasının tarafından hazırlanan biyosensör.	9
Şekil 1.9. Biyosensör yapısı.	9
Şekil 1.10. Bazı biyobileşenlerin yapısı.	10
Şekil 1.11. Amperometrik enzim elektrodu sınıfları a) I. Nesil Amperometrik elektrotlar; b) II. Nesil Amperometrik elektrotlar; c) III. Nesil Amperometrik elektrotlar	12
Şekil 1.12. Glikoz oksidazın yapısı.	16
Şekil 1.13. Glikoz oksidaz enziminin işleyiş mekanizması.	16
Şekil 1.14. Üreazın etki mekanizması.	17
Şekil 1.15. Tirosinaz enziminin işleyiş mekanizması.	17
Şekil 1.16. a) Michaelis-Menten eğrisi; b) Lineweaver-Burk grafiği.	19
Şekil 1.17. Enzim immobilizasyon yöntemleri.	20
Şekil 1.18. Sıklıkla kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar a) diflorodinitrobenzen; b) heksametilen diizosiyanat; c) glutraldehit; d) 1,6 bis(maleimido)hekzan; e) disüksinilsüberat.	21
Şekil 2.1. Askorbik asit biyosensörünün hazırlanışı	22
Şekil 3.1. Çalışma düzeneği.	26
Şekil 3.2. SNS tabanlı monomerlerin sentezi.	28
Şekil 3.3. 1-(2-azido-etil)-2,5-di-tiyofen-2-il-H-pirol sentezi.	28
Şekil 3.4. SNS-Fc sentezi.	29
Şekil 3.5. 4-ferrosenil-1-(4-pirol-1-il-bütül)-1H-[1,2,3]triazol (Py-Fc) sentezi.	29
Şekil 3.6. Tez kapsamında sentezlenen ve kullanılan monomerler.	30
Şekil 3.7. Elektrokimyasal polimerizasyon.	30
Şekil 3.8. Polifenollerin ölçüm mekanizması.	32
Şekil 4.1. ACN/LiClO ₄ - NaClO ₄ ortamında, a) SNS-An'ın 100 mV/s'deki dönüşümlü voltamogramı; b) P(SNS-An)'in farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları; c) P(SNS-An)'in anodik ve katodik akımların tarama hızı	37

Şekil 4.2. Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörü için a) akım – potansiyel; b) akım – pH grafikleri	38
Şekil 4.3. Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX için a) 0,7 V’da akım – zaman; b) akım-derişim; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	39
Şekil 4.4. Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü	40
Şekil 4.5. Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX için a) -0,7 V’da akım – zaman; b) akım-derişim; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	41
Şekil 4.6. P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği	41
Şekil 4.7. EDOT ve SNS-An’in ACN/LiClO ₄ - NaClO ₄ ortamında, 100 mV/s’deki dönüşümlü voltamogramı.	42
Şekil 4.8. Pt/P(SNS-An) ve Pt/P(SNS-An -ko –EDOT) elektrotların ACN/LiClO ₄ ortamında, a) kopolimerin farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları; b) anodik ve katodik akımların tarama hızı ile değişimi; c) homopolimer ve kopolimerin 100 mV/s CV’inin karşılaştırılması.	43
Şekil 4.9. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörü için a) akım – potansiyel; b) akım - pH grafikleri.....	43
Şekil 4.10. Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX 0,6 V’da a) akım – zaman; b) akım değişimi - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	44
Şekil 4.11. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü	45
Şekil 4.12. Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX -0,7 V’da a) akım – zaman; b) akım değişimi - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	46
Şekil 4.13. Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü	47
Şekil 4.14. Pt/P(SNS-An- co –EDOT)/C60/GOX biyosensörü için a) akım – potansiyel; b) akım – pH grafikleri	47
Şekil 4.15. Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/C60/GOX biyosensörünün 0,55 V’daki a) akım – zaman; b) akım değişimi - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	48
Şekil 4.16. Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/C60/GOX biyosensörünün raf ömrü.....	49
Şekil 4.17. Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/C60/GOX biyosensörünün -0,7 V’da a) akım – zaman; b) akım değişimi - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	50
Şekil 4.18. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/C60/GOX biyosensörünün raf ömrü	50
Şekil 4.19. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/GOX biyosensörünün a) 0,6 V; b) -0,7 V çalışma potansiyelinde askorbik asit (AA), sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit (SA) girişim etkisi.....	51
Şekil 4.20. SNS-Et’in ACN/LiClO ₄ ortamında, 100 mV/s’deki dönüşümlü voltamogramı	53
Şekil 4.21. ACN/LiClO ₄ ortamında, a) P(SNS-Et)’in farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları b) P(SNS-Et)’in anodik ve katodik akımların tarama hızı ile değişimi.	54

Şekil 4.22. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörünün akım-pH grafiği.....	55
Şekil 4.23. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım-enzim miktarı; b) akım-gluteraldehit miktarı grafikleri	56
Şekil 4.24. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri.....	56
Şekil 4.25. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği .	57
Şekil 4.26. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörüne askorbik asit (AA), sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit (SA) in girişim etkisi (-0,7V).....	58
Şekil 4.27. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği	58
Şekil 4.28: SNS-HE'in ACN/LiClO ₄ ortamında, 100 mV/s'deki homopolimerin dönüşümlü voltamogramları.	59
Şekil 4.29. ACN/LiClO ₄ ortamında, a) P(SNS-HE)'in farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları; b) akım-tarama hızı grafiği	60
Şekil 4.30. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım-potansiyel; b) akım-pH grafiği (0,10 M fosfat tamponu, 0,70 V, oda sıcaklığı).....	60
Şekil 4.31. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım-enzim miktarı; b) akım- gluteraldehit miktarı grafikleri	61
Şekil 4.32. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün akım-CNT miktarı grafiği	62
Şekil 4.33. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım–zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	63
Şekil 4.34. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği	63
Şekil 4.35. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği	64
Şekil 4.36. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım – zaman, b) akım - glikoz derişimi, c) kalibrasyon, d) Lineweaver-Burk grafikleri	65
Şekil 4.37. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği	65
Şekil 4.38. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği	66
Şekil 4.39. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün a) 0,7 V; b) -0,7 V çalışma potansiyelinde askorbik asit (AA), sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit (SA) girişim etkisi.	66
Şekil 4.40. SNS-Fc'in ACN/LiClO ₄ ortamında, 100 mV/s'deki dönüşümlü voltamogramı.	68
Şekil 4.41. P(SNS-Fc)'in ACN/LiClO ₄ ortamında, a) farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları; b) akım-tarama hızı grafikleri.....	69
Şekil 4.42. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörü için a) akım-potansiyel grafiği; b) akım- pH grafikleri	70
Şekil 4.43. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensöründe CNT miktarının amperometrik cevaba etkisi.....	71

Şekil 4.44. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım- enzim miktarı, b) akım- glutraldehit miktarı grafikleri	71
Şekil 4.45. Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,6 V'daki a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	72
Şekil 4.46. Pt/P(SNS-Fc) /GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği.....	73
Şekil 4.47. Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,4 V'daki a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	74
Şekil 4.48. Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörün ard arda kullanılabilirlik grafiği.....	74
Şekil 4.49. Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği.....	75
Şekil 4.50. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V'daki a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	76
Şekil 4.51. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği	76
Şekil 4.52. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V'daki a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	77
Şekil 4.53. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği.	78
Şekil 4.54. Pt/P(SNS-Fc)CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği.....	78
Şekil 4.55. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün a) 0,6 V; b) 0,4 V'da ve Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörün, c) 0,4 V; d) 0,6 V'da askorbik asit, sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit girişim etkisi.....	79
Şekil 4.56. SNS-Fc ve EDOT monomerlerin ACN/LiClO ₄ ortamında, 100 mV/s'deki dönüşümlü voltamogramı.....	81
Şekil 4.57. P(SNS-Fc –ko- EDOT)'un ACN/LiClO ₄ ortamında, a) farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları; b) akım-tarama hızı grafiği.....	82
Şekil 4.58. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım – potansiyel; b) akım- pH grafikleri.....	83
Şekil 4.59. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensöründe CNT miktarının amperometrik cevaba etkisi.....	83
Şekil 4.60. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım-enzim miktarı; b) akım - glutraldehit miktarı grafikleri.....	84
Şekil 4.61. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörünün 0,6 V'daki a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri.....	85
Şekil 4.62. Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT) /GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği	85
Şekil 4.63. Pt/P(SNS-Fc -ko– EDOT)/GOX biyosensörünün 0,4 V'daki a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri.....	86
Şekil 4.64. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği	87
Şekil 4.65. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT) /GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği	87

Şekil 4.66. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V'daki a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver- Burk grafikleri	88
Şekil 4.67. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği	89
Şekil 4.68. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V'daki a) akım – zaman; b) akım değişim - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	90
Şekil 4.69. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği	91
Şekil 4.70. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği	91
Şekil 4.71. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörünün a) 0,4 ;, b) 0,6 V ve Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün c) 0,4 V; d) 0,6 V askorbik asit, sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit girişim etkisi.	92
Şekil 4.72. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörünün a) akım – potansiyel grafiği; b) akım – pH grafikleri	94
Şekil 4.73. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörünün a) akım-enzim miktarı; b) akım-gluteraldehit miktarı grafikleri.....	95
Şekil 4.74. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörünün a) akım – zaman; b) akım - üre derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	96
Şekil 4.75. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği	97
Şekil 4.76. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensör raf ömrü grafiği	97
Şekil 4.77. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz biyosensörünün a) akım – zaman; b) akım - üre derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri.....	98
Şekil 4.78. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği	99
Şekil 4.79. a) Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz; b) Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörlerinin askorbik asit, glikoz, ürik asit ve laktik asit ile girişim etkisi.	100
Şekil 4.80. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO biyosensörünün a) akım-potansiyel; b) akım - pH grafikleri	101
Şekil 4.81. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO biyosensörünün a) akım -enzim miktarı; b) akım - gluteraldehit miktarı grafikleri	102
Şekil 4.82. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO biyosensörünün a) akım – zaman; b) akım - katekol derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	103
Şekil 4.83. Pt/P(SNS-Fc-ko-EDOT)/CNT/PPO biyosensörünün a) akım-potansiyel; b) akım - pH grafikleri	104
Şekil 4.84. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/PPO biyosensörünün a) akım-enzim miktarı; b) akım - gluteraldehit miktarı grafikleri.....	105

Şekil 4.85. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/PPO biyosensörünün a) akım – zaman; b) akım - katekol derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri	106
Şekil 5.1. H ₂ O ₂ takibi yapılan biyosensörlerin karşılaştırılması.....	108
Şekil 5.2. Oksijen takibi yapılan biyosensörlerin karşılaştırılması (-0,7 V).....	109
Şekil 5.3. Glikoz biyosensörlerinde kopolimer etkisi a) 0,7 V; b) -0,7 V.....	110
Şekil 5.4. SNS-Fc ile hazırlanan elektrotların a) 0,4 V; b) 0,6 V kalibrasyon grafiklerinin karşılaştırılması.	110
Şekil 5.5. P(SNS-An –ko- EDOT) ile hazırlanan glikoz biyosensörlerde CNT ve C ₆₀ karşılaştırması a) 0,6 V; b) -0,7 V.	111
Şekil 5.6. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz ve Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörlerinin a) akım – derişim; b) doğrusal aralık grafikleri.	113
Şekil 8.1: GCE/P(SNS-An- ko –EDOT)/CNT/GOX için akım – zaman grafiğı	127
Şekil 8.2. Ptdisk/P(SNS-An- ko –EDOT)/CNT/GOX için akım – zaman grafiğı.....	127

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. İçeceklerde glikoz tayini.....	52
Çizelge 4.2. P(SNS-Et) ile hazırlanan biyosensörlerle içeceklerde glikoz tayini.....	58
Çizelge 4.3. P(SNS-HE) ile hazırlanan biyosensörlerle içeceklerde glikoz tayini.	67
Çizelge 4.4. P(SNS-Fc) ile hazırlanan biyosensörlerle içeceklerde glikoz tayini.	80
Çizelge 4.5. P(SNS-Fc -ko- EDOT) ile hazırlanan biyosensörlerle içeceklerde glikoz tayini.....	93
Çizelge 4.6. Üre biyosensörlerinin gerçek numune analizleri.	100
Çizelge 5.1. Ferrosen medyatörü ile hazırlanan biyosensörlerin (0,4 V'da) gerçek numune analiz sonuçları.....	112
Çizelge 5.2. Tasarlanan biyosensörlerin analitik performansları.	115

1. GİRİŞ

1.1. İletken Polimerler

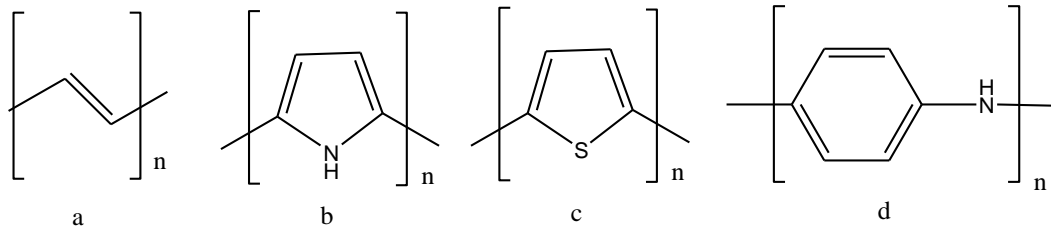
İlk üretilen polimerler yalıtkanlığından dolayı elektrik kablolarında çokça tercih edilmişlerdir. Bu polimerler kolay işlenebilmeleri, esneklikleri, hafif olmaları gibi özelliklere sahiptirler. Metaller yüksek elektrik iletkenliği ve üstün mekaniksel özelliklerine rağmen esnek olmamaları, ağır olmaları ve işlenmeleri zor olması endüstride kullanımlarını sınırlı kılmıştır. Bu sebeple metallerin elektriksel iletkenlikleri ile polimerin özelliklerini barındıran yeni maddeleri üretmek için günümüze değin çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar öncelikle polimerlerle metallerin kompozitinin yapılması üzerine yoğunlaşmışsa da, daha sonraki çalışmalar sonucunda iletken polimerler elde edilmiştir (Saçak 2010).

1974'te Shirakawa ve arkadaşları, Ziegler-Natta katalizörü kullanarak poliasetilen film sentezlemişlerdir 1977'de yine aynı bilim insanları poliasetilen filmlerinin halojen buharlarına (iyot, klor veya flor) maruz bırakıldığında bu polimerin yükseltgendiğini ve iletkenliğinin artarak 10^5 S/cm seviyesine çıktığını keşfetmişlerdir. Uygun koşullarda katılan poliasetilen filmlerinin iletkenlik değeri bakır, gümüş gibi metallerin iletkenliği olan 10^6 S/cm seviyesine çok yakındır. Shirakawa, Heeger ve MacDiarmid bu çalışmalarından dolayı 2000 yılı Kimya Nobel ödülünü almışlardır (Uçan 2015).

Polimer örgüsünde, elektronların zincir boyunca taşınmasını sağlayan uygun elektroaktif merkezlerin bulunması halinde iletkenlik oluşur. İletken polimerler konjuge yapıya sahip olmalarından dolayı zincir üzerindeki elektronun tüm zincir üzerinde hareket etmesini sağlar, böylelikle bazı polimerler yarı iletken, hatta metalik özellik gösterebilmektedir (Heeger 2001).

Konjuge polimerlerde zincir uzunluğu arttıkça değerlik bandı ile iletkenlik bandı arasındaki bant aralığı azalmaktadır. Ancak konjuge polimerlerde zincir uzamasıyla konjugasyonun artırılması yüksek iletkenlik için yetersiz kalmaktadır. Yüksek iletkenlik katılama (doplama) ile kimyasal ya da elektrokimyasal olarak uygulanmasıyla sağlanabilmektedir. Katılama sonucu yapıda oluşan pozitif veya negatif yüklü bölgeler boyunca elektronların hareketi iletkenliğin artmasını sağlamaktadır. Elektrokimyasal olarak katılama potansiyel uygulanmasıyla sağlanır. Polimer yapısından bir elektron ayrılması ile radikal katyon (polaron), ikinci elektronun ayrılmasıyla dikatyon (bipolaron) oluşmaktadır (Güven 2016).

Poliasetilenin oksijen varlığında bozunması nedeni ile yeni iletken polimerlerin sentezlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda özellikle polipirol, politiyofen, polianilin ve benzeri polimerler öne çıkmıştır. Politiyofenin iletkenlik değeri poliasetilenin iletkenliğinden az olmasına rağmen hava ortamında oldukça kararlı ve dayanıklılığa sahiptir. Ancak bu polimerlerin uygulanması çözünürlük sorunları nedeni ile endüstride kullanılması sınırlı kalmıştır. İletken polimerler kimyasal yöntemlerle sentezlenebildiği gibi elektrokimyasal yöntemlerle de sentezlenebilmektedirler. Günümüzde iletken, kararlı ve çözünebilir iletken polimer sentezi üzerinde çalışmalar devam etmektedir (Uçan 2015). Bazı iletken polimerlerin yapıları Şekil 1.1.'de gösterilmektedir.



Şekil 1.1. İletken polimerler: **a)** Poliasetilen; **b)** Polipirol; **c)** Polityofen; **d)** Polianilin

İletken polimerlerin kullanım alanları; transistörler (Horowitz 1998), ışık saçan diodlar (Burroughes 1990), güneş pilleri (Cravino 2002), yarı iletken çipler, elektrokromik cihazlar (Sommani 2002), hafif pil bileşenleri, sensörler, antistatik kaplamalar, antistatik ambalaj ve paketleme şeklinde sıralanabilir (Saçak 2010). İletken polimerlerin erime ve çözünme sorunları onların kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. İletken polimerler biyosensörlerde immobilizasyon matriksi olarak kullanılmaktadır. Biyomoleküllerin elektrot yüzeyine immobilize edilmesini sağlamaktadır. İletken polimerin iletkenliğinin iyi olması elektrot yüzeyindeki elektron transferi için önemlidir. İletken polimerler biyomolekül ve elektrot arasında bağlantıyı sağlar ve destek görevi yapmaktadır (Özöner 2010).

1.1.1. İletken polimerlerin sentez yöntemleri

İletken polimerler için en çok tercih edilen sentez yöntemleri kimyasal ve elektrokimyasal polimerizasyon teknikleridir. Bu yöntemler haricinde fotokimyasal polimerizasyon, plazma polimerizasyonu, katı hal polimerizasyonu, katılma polimerizasyonu ve piroliz yöntemi gibi farklı yöntemlerle de iletken polimerler sentezlenebilmektedir (Kumar 1998).

1.1.1.1. Kimyasal yöntem

Kimyasal polimerleşme yöntemi monomerin uygun çözücü, sıcaklık ve katalizör varlığında polimerleştirilmesi esasına dayanır. Bu yöntemde katalizör monomerler ile reaksiyona girerek önce oligomer ve daha sonrada oligomerlerin birleşmesiyle de polimer oluşmasını sağlar. Bu yöntemde konjuge bağların korunmasına dikkat edilmesi gerekir. Kimyasal polimerleşmenin avantajı çok miktar polimerin üretimine olanak sağlaması, dezavantajı ise; sentez ortamından meydana gelen yan ürünlerin uzaklaştırılma problemi.

1.1.1.2. Elektrokimyasal yöntem

Kimyasal yöntemde başlatıcı kullanılmasına rağmen elektrokimyasal yöntemde başlatıcı olarak elektriksel alan etkisi kullanılmaktadır. Bu yöntemde monomer uygun çözücü ortamında destek elektrolitle beraber çalışma elektrodu yüzeyinde polimerleştirilir. Çalışma elektrodu olarak altın, platin, karbon disk elektrot gibi çeşitli elektrotlar kullanılabilir. Çoğu konjuge polimerler elektrokimyasal yöntemle elde

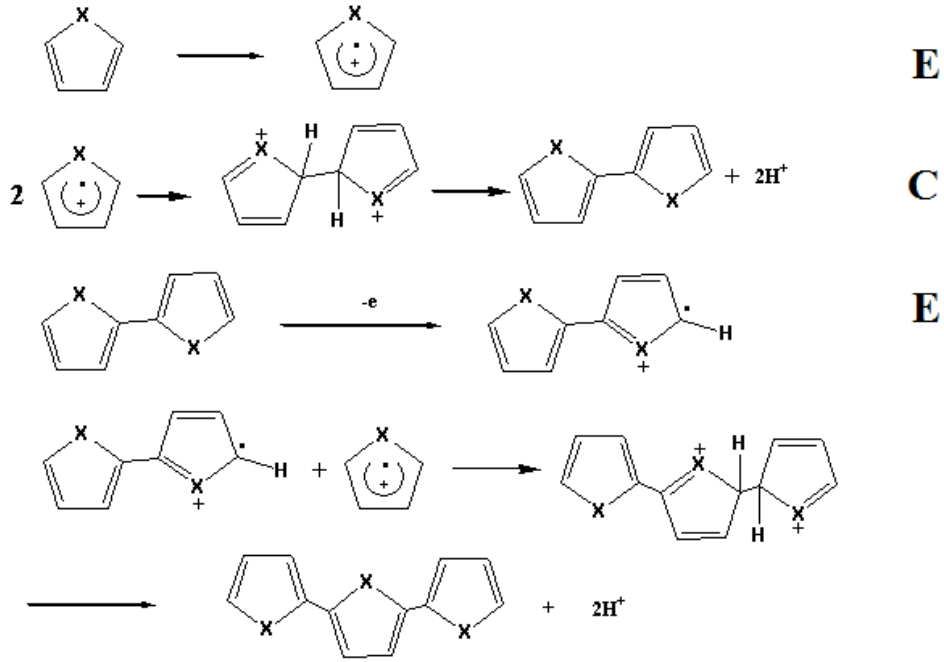
edilebilir. Elektropolimerizasyon potansiyostatik, galvanostatik ve potansiyodinamik gibi metotlarla yapılabilmektedir.

Elektrokimyasal yöntemin diğer yöntemlere göre avantajları;

- reaksiyon oda sıcaklığında gerçekleşebilmesi,
- polimer filmin kalınlığı kontrol edilebilmesi,
- polimer elektrot yüzeyinde biriktiğinden yüksek saflıkta elde edilebilmesi,
- optikçe inaktif elektrotlar üzerinde homojen filmler elde edilebilmesi ve bunların daha sonra spektroskopik yöntemler ile karakterize edilebilmesi,
- az miktarda monomer kullanımına olanak sağlaması,

gibi avantajları bulunmaktadır (Uçan 2015).

Çoğu iletken polimerler pirol, tiyofen, anilin ve furan gibi aromatik moleküllerin elektrokimyasal olarak yükseltgenmesiyle oluşurlar. Elektrokimyasal polimerizasyon mekanizması üç basamak içermektedir. Elektrokimyasal (E) basamak sisteme uygulanan potansiyel ile nötral monomerin yükseltgenmesi ve radikal katyonun oluşumudur. Kimyasal (C) basamak önceki basamakta oluşan iki radikal katyon birleşmesi ya da radikal katyonu ile nötral bir monomer birleşerek dimer oluşturması içerir. Elektron transfer reaksiyonunun hızı, çözeltilinin kütle kısmından monomerin elektrot yüzeyine difüzyon hızına göre fazla olması elektrot çevresinde radikallerin daha yüksek derişiminde bulunmasına sebep olur. Yani iki radikal katyonun birleşerek dimer dikatyon oluşturma olasılığı daha fazladır. Dimer dikatyon iki proton kaybetmesiyle dimer yapı oluşur. Konjugasyon artışından dolayı dimerin yükseltgenme potansiyeli monomerinkine göre düşük olmasından dolayı yükseltgenme monomere göre dimerde daha kolay gerçekleşir. Son basamakta nötral dimerin elektrokimyasal (E) olarak yükseltgenmesi ile radikal dimer katyonun oluşumudur. (Roncali 1992; Güven 2016). Elektrokimyasal polimerizasyon süreci yukarıda anlatılan ECE basamaklarının birbirini takip etmesiyle elektroaktif polimer oluşması ve elektrot yüzeyinde film olarak birikmesine dayanmaktadır. Tiyofen ve pirol gibi heteroaromatik yapılar için Şekil 1.2.'de ECE mekanizması görülmektedir.



Şekil 1.2. Elektropolimerizasyon sırasında gerçekleşen ECE mekanizması (X = S, O, NH)

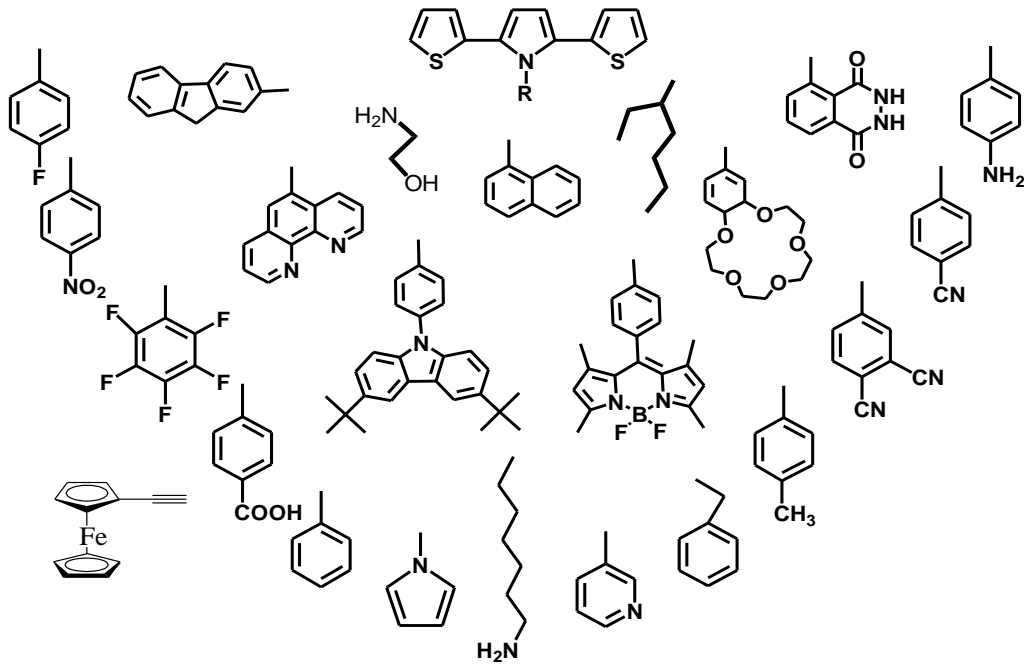
Elektropolimerizasyon seyreltik monomer ve elektrolit içeren uygun çözelti içerisinde hem karşı elektrot hem de referans elektrodu varlığında potansiyel uygulanmasıyla çalışma elektrodu yüzeyinde polimer film oluşumuyla gerçekleştirilir. (Çatalkaya 2011). Elektrokimyasal polimerizasyon sırasında kullanılan çözücünün dielektrik sabitinin yüksek olması, destek elektroliti çözme ve iyonları birbirinden iyi ayırabilme özelliğinin bulunması istenmektedir. En çok kullanılan çözücüler asetonitril, benzonitril, propilen karbonat, nitrobenzen gibi çözücülerdir. Elektropolimerizasyon ortamında destek elektrolit elektriksel iletkenliği sağlayabilmek için kullanılır. Elektrolit seçimi için en önemli kriterler, elektrolitin çözünürlüğü, ayrışma derecesi ve nükleofilik derecesidir. Destek elektrolit türü iletken polimer filmin elektrokimyasal morfolojisini ve özelliğini etkilemektedir. İletken polimerlerin elektrokimyasal sentezinde genellikle ClO_4^- , BF_4^- gibi anyonlarının lityum ya da tetraalkilamonyum tuzlarını içeren destek elektrolitler kullanılmaktadır (Reynolds 1989).

1.1.2. Poli (2,5-ditienilpirol) (PSNS) Türevleri

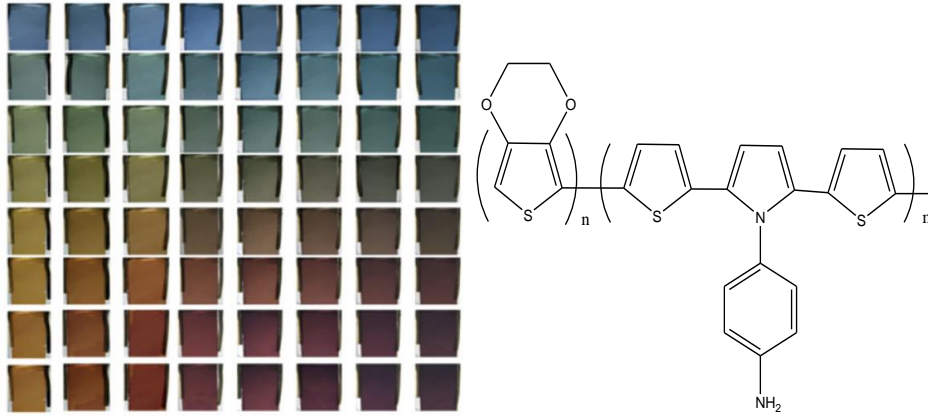
Bilindiği üzere iletken polimerlerin optik, elektronik ve morfolojik özellikleri polimer ana zincir yapısında bulunan grupların büyüklüğüne ve elektron alıcı veya elektron verici nitelikte olmasına göre değişim göstermektedir. Farklı özelliklere sahip birimlerin tek bir monomer yapısı içinde birleştirilmesi, birimlerden kaynaklı özelliklerin sentezlenen polimerlere aktarılmasını ve polimerin özelliklerinin değiştirilmesini, geliştirilmesini sağlamaktadır. Elektrokromik cihazlar, biyosensörler gibi uygulama alanlarında kullanılacak nitelikte polimerlerin yapımı temel olarak başlangıç birimlerinin tasarımıyla ilgilidir.

Polipirollar, kolay fonksiyonlandırılabilirleri ve redoks özellikleri, politiyofenler ise yüksek iletkenlik göstermeleri ve diğer iletken polimerlerden daha kararlı olmalarından dolayı ilgi çekmişlerdir. Bu polimerlerin özelliklerinin tek bir polimerde birleştirilmesi için yapısında hem tiyofen hem de pirol grupları içeren iletken polimerler sentezlenmiştir. Söz konusu polimerlerin elde edilebilmesi için ilk olarak tiyofen ve pirol monomerlerin uygun ortamda kopolimerizasyona tabi tutulmuştur. Ancak iki monomerin yükseltgeme potansiyellerin birbirinden çok farklı olması araştırmacıların her iki heterosiklik yapıyı da barındıran monomerler sentezlemelerine neden olmuştur. Yapısında üçlü heterosiklik yapı bulunan monomeri 1987 yılında Ferraris ve grubu tarafından sentezlenmiştir (Ferraris 1987).

2,5-ditiyeniłpirol (SNS) monomerlerinin türevlendirilmesi genellikle pirol ünitesi üzerinden bazı grupların bağlanmasıyla yapılmıştır. SNS monomerlerinin sentezinin kolay olması ve üretilen polimerlerin iyi elektriksel, optik özellikler göstermesinden dolayı çeşitli araştırma gruplarının ilgisini çekmiş ve çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bugüne kadar sentezlenen bazı SNS tabanlı iletken polimerler Şekil 1.3.'te gösterilmiştir.



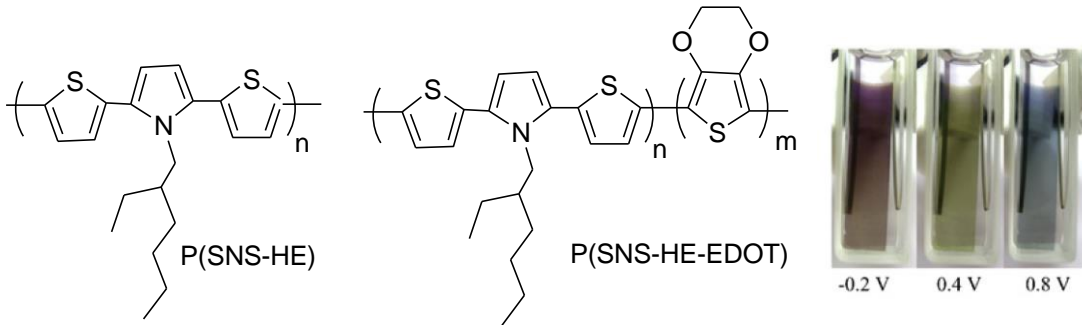
Şekil 1.3. Bazı SNS tabanlı iletken polimerler



Şekil 1.4. SNS-An'ın EDOT ile kopolimerlerine ait renkler (Yıldız 2008; Çamurlu 2014)

Çamurlu ve arkadaşları tarafından 1-benzil-2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol (SNBS) monomerinin EDOT (3,4 etilendioksitiyofen) ile kopolimerizasyonu sonucunda çok iyi özelliklere sahip multikromik polimerler (Çamurlu 2008) elde edilmiştir. Yıldız ve arkadaşları P(SNS-An) homopolimerinin elektrokimyasal özelliklerini incelemiştir. Homopolimerinin π - π^* geçişine sahip olduğunu bant gap aralığının ise 2,12 eV olduğunu bulunmuştur. Homopolimer yükseltgendiğinde mavi ve indirgendiğinde ise sarı renktedir. SNS benzenamin ile EDOT kopolimerinin bant gap aralığının 1,7 eV olduğu belirlenmiş, elektrokimyasal sentez koşullarının değiştirilmesi ile kopolimerin toplam 48 farklı tonda renklendirildiği göstermiştir (Yıldız 2008). Şekil 1.4.'de SNS-An'ın türevinin EDOT ile yaptığı kopolimerlere ait renkler ve kopolimerin yapısı gösterilmektedir.

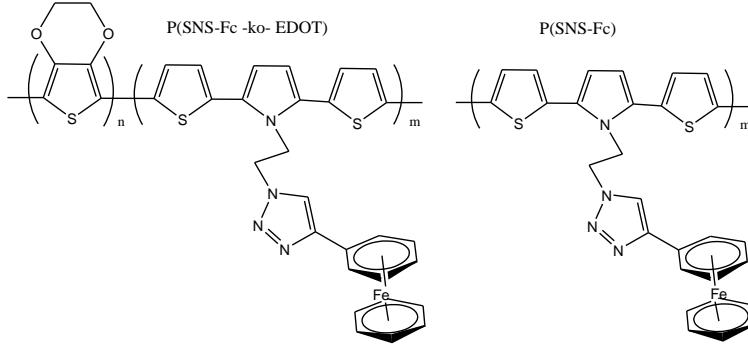
Çamurlu ve arkadaşları SNS türevi olan 1-(2-etil-hegzil)-2,5-di-tiyofen-2-il-2,3-dihidro-1H-pirol (SNS-HE) sentezlemiş ve elektrokimyasal özellikleri açısından incelemiştir. Homopolimer ve kopolimerin π - π^* geçişine sahip olduğunu ve P(SNS-HE), P(SNS-HE-co-EDOT) için bant aralıklarının sırasıyla 2,59 ve 1,72 eV olduğu bulunmuştur. Homopolimerde sadece sarı-mavi renk değişimi gözlemlenirken, kopolimerinde kırmızı kahverengi, yeşil ve mavi renkler olmak üzere multikromik davranış gözlemlenmiştir. (Çamurlu 2012)



Şekil 1.5. P(SNS-HE) ve P(SNS-HE-co-EDOT) polimerlerinin yapıları

Bicil ve arkadaşları ferrosen grubu bağlı SNS türevi olan SNS-Fc (4-ferrosenil-1-[2-(2,5-di-tiyofen-2-il-pirol-1-il)-etil]-1H-[1,2,3]triazol) sentezlenmiş ve bu polimerin elektrokimyasal özellikleri incelenmiştir (Şekil 1.6.). Sentezlenen polimer zinciri üzerindeki ferrosen gruplarının sırası ile 0,56 V ve 0,44 V 'da yükseltgenip indirgendiği,

polimerin ise yükseltgenme ve indirgenme potansiyeleri sırasıyla 0,76 V ve 0,64 V olduğu tespit edilmiştir. Homopolimerin sarıdan maviye renk değişimi gözlemlenmiştir. Bu monomerin EDOT ile kopolimeri ise 4 farklı renk göstererek multikromik davranış sergilemiştir. Homopolimerin ve kopolimerin bant aralığı sırasıyla 2,61 ve 1,88 eV olarak hesaplanmıştır (Bicil 2013).



Şekil 1.6. P(SNS-Fc) ve P(SNS-Fc-co-EDOT) polimerlerinin yapıları

PSNS türevleri elektrokromik malzeme olarak kullanılmasının yanısıra son dönemde özellikle amperometrik biyosensörlerde elektroaktif matris olarak kullanılmışlardır. Tuncagil ve arkadaşları poli (4-(2,5-di(tiyofenil-2-yl)-1H-pirol-1-l)) benzenamin [poli(SNSNH₂)] (Tuncagil 2011) ve poli(1-(4-nitrofenil)-2,5-di(2-tiyenil)-1H-pirol) [poli(SNSNO₂)] (Tuncagil 2010) iletken polimerlerle glikoz oksidaz enzimi immobilizasyonu ile glikoz biyosensörüne başarıyla uygulamıştır. Ayrıca 4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)amidoferrosenilditiyo-fosfonat (SNS-NH₂-Fc) (Ayrancı 2015), 4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)bütan-1-amin (TPA) (Soğancı 2014), 4-amino-N-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benzamid (HKCN) (Güler 2014) gibi SNS tabanlı monomerlerden hazırlanan iletken polimerler çeşitli biyosensör uygulamalarında kullanılmıştır.

1.2. Biyosensörler

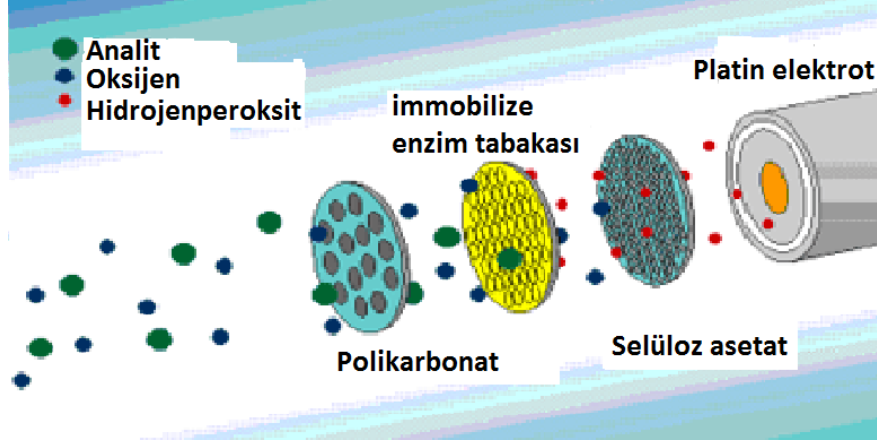
Gıda analizlerinde, sağlık sektöründe, çevre kirliliğın izlenmesinde ve güvenlik alanında (biyoterörizm) biyolojik molekülerin algılanması, izlenmesi ve tanınmasında güvenilir, hızlı ve ekonomik sistemlere gereksinim duyulmaktadır. Bundan dolayı çeşitli bilim dallarında araştırma yapan bilim insanları daha etkin ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi için çalışmalarını sürdürmektedirler. Biyosensörler temel olarak biyomoleküllerin hedef analit ile etkileşimi sonucu meydana gelen bir değişimi dönüştürücü yardımıyla sinyal olarak veren cihazlardır (Çolak 2014). IUPAC' ye göre bir biyosensör, biyokomponent kullanarak özgün nicel veya yarı-nicel analitiksel bilgiyi sağlama yeteneğine sahip olan ve kendi kendine yeten cihaz olarak tanımlanır (Şahin 2014). Biyosensörlerin şematik gösterimi Şekil 1.7'de sunulmuştur.



Şekil 1.7. Analit, biyobileşen, fiziksel bileşen ve ölçüm cihazı gibi bileşenleri olan biyosensörlerin şematik gösterimi

1.2.1. Biyosensörlerin Tarihi

1962 yılında Cincinnati Çocuk Hastanesinde (Ohio, ABD) Clark ve Lyons'ın enzim elektrotları ile yaptıkları çalışmaları ile biyosensörlerin tarihi başlamıştır. Yarı-geçirgen bir diyaliz membranı yardımıyla standart bir oksijen elektrodunun glikoz oksidaz ile ince bir tabaka halinde kaplanmasıyla ilk enzim elektrodu hazırlanmıştır. Elektrokimyasal ölçümler, enzim katalizli tepkime ile tüketilen oksijen miktarının takip edilmesini esas almaktadır (Wang 2008). Guilbault ve Lubrano 1973 yılında glikozun glikoz oksidaz enzimi ile glukolaktona dönüşürken üretilen hidrojenperoksidin ölçümüne bağlı olarak glikozun tayini için biyosensör geliştirmişlerdir (Guilbault 1973; Dwevedi 2016). Diyabet hastaları için kan ve idrarda glikoz tayinine imkan veren glikoz oksidaz elektrodu ticari olarak ilk üretilen biyosensör olup 1975 yılında Yelloy Springs Instruments firması tarafından Model 23A YSI olarak piyasaya sürülmüştür. Bu ticari ürünün ölçüm prensibi, glikoz oksidazın katalizlediği tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksidin amperometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. Daha sonraki yıllarda biyosensörlerin minyatüre edilmesi ve basitleştirilmesi ile bireylerin yardıma gerek duymadan kendi kendilerine kandaki glikoz miktarını ölçebilecek cihazlar tasarlanmış ve piyasaya sunulmuştur.

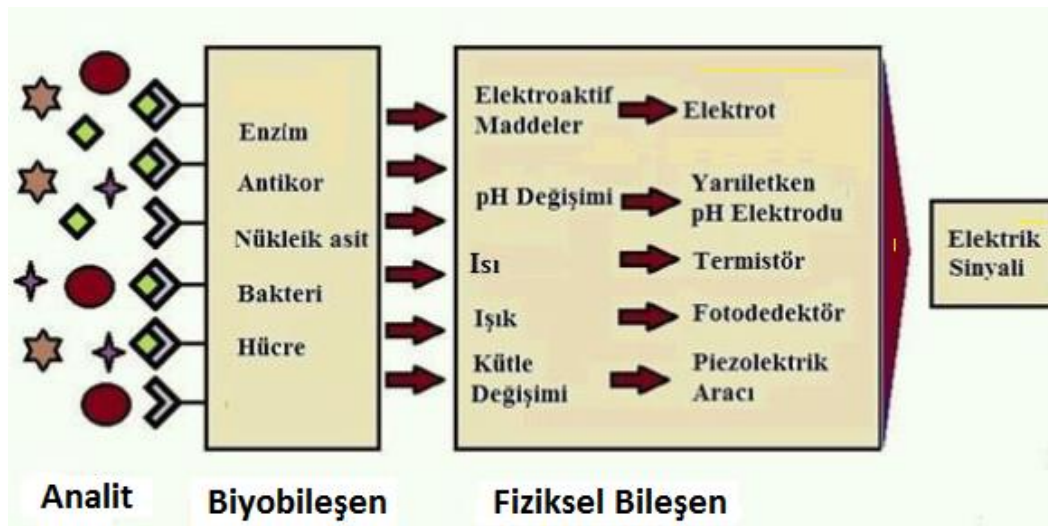


Şekil 1.8. YSI firmasının tarafından hazırlanan biyosensör (Anonymous 1)

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre, savunma sanayi ve birçok endüstriyel alanda özellikle otomasyon ve kalite kontrolünde çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180’den fazla madde için biyosensör çalışması yapılmış, ancak sınırlı sayıda ticari olarak üretilmiştir (Pınarbaşı 2009; Telefoncu 2012).

1.2.2. Biyosensörlerin yapısı

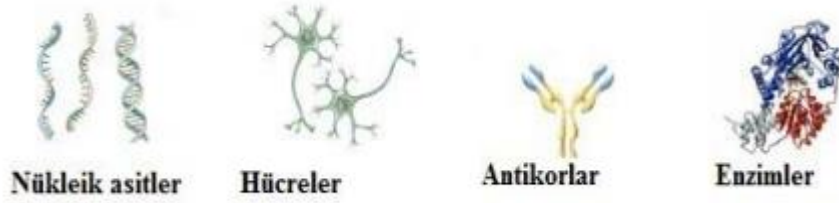
Biyosensör, analite spesifik tanıma mekanizmasına sahip biyobileşenin analit ile etkileşmesinden oluşan süreçleri elektronik sinyallere dönüştürebilen fiziksel bileşen ve elektronik parçalardan oluşmaktadır (Çolak 2014). Şekil 1.9’da bir biyosensörün yapısı şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 1.9. Biyosensör yapısı

1.2.2.1. Biyobileşenler

Biyobileşenler numune ile yüksek spesifiklikte etkileşmesiyle analiz için ilk basamağı oluştururlar. Biyobileşen olarak enzimler, antikorlar, nükleik asitler, mikroorganizmalar, doku kültürleri ve organeller kullanılmaktadır. Ölçülmek istenen analite karşı sensörün seçici olarak davranmasını sağlamaktadırlar. Şekil 1.10'da bazı biyobileşenlerin yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.10. Bazı biyobileşenlerin yapısı

1.2.2.2. Fiziksel bileşenler

Fiziksel bileşenler biyolojik reaksiyon sonucunda meydana gelen değişime bağlı olarak elde edilmek istenen sinyalin türüne göre elektrokimyasal, optik, kütle ve ısı ölçüm sistemleri olmak üzere sınıflandırılabilir.

1.2.3. Biyosensör türleri

1.2.3.1. Optik biyosensörler

Genel olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir molekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan ölçüm aygıtlarına optik biyosensörler denir. Ölçülen sinyal, ışık yansımaları, saçılması veya yayılması sonucu oluşan kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimden kaynaklanmaktadır. Enzim esaslı hazırlanan optik biyosensörler temelde adsorbsiyon, floresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde çalışırlar (Can 2010).

1.2.3.2. Piezoelektrik biyosensörler (QCM)

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki değişimleri belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Kuvartz kristal mikrodenge (QCM) olarak da bilinmektedir. QCM sisteminde kullanılmakta olan kuvartz kristallerin yüzeyine bağlanan madde miktarına göre sinyal üretilir (Ayhan 2014). Sensör seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığında veya biriktiğinde piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki değişiminin ölçülmesiyle sonuca ulaşırlar.

1.2.3.3. Termal biyosensörler

Kalorimetri esaslı biyosensörlerde bir enzimatik reaksiyon sırasında entalpi değişiminden yararlanarak analit miktarının tayini gerçekleşir. Çok küçük sıcaklık değişimleri termal olarak izole ortamlarda termistör veya termofiller yardımıyla takip edilmektedir. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimleri ile substrat derişimi arasındaki doğrusal ilişkiden faydalanarak ölçümler alınmaktadır (Can 2010).

1.2.3.4. Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörlerin temeli, biyo-etkileşim işlemi süresince elektrokimyasal türlerin üretilmesi veya tüketilmesiyle oluşan sinyalin elektrokimyasal bir yöntem ile ölçülmesine dayanmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler dedektör sistemine göre üç sınıfa ayrılır (Chaubey 2002). Elektrokimyasal tepkimeler sonucunda, elektrotlar arasındaki ortamın akımındaki değişiklik (amperometri), ölçülebilir potansiyel farkı (potansiyometri) veya ölçülebilir iletkenlik değişimi (kondüktometri) meydana gelmektedir (Çolak 2014). Elektrokimyasal biyosensörler hızlı, pratik ve ekonomik olmaları gibi avantajlarından dolayı diğer fiziksel bileşenlere sahip türlere göre daha fazla tercih edilmektedir.

1.2.3.4a. Potansiyometrik biyosensörler

Bu yöntem temel olarak bir çalışma elektrodu ile referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçülmesine dayanmaktadır. Ölçülen potansiyel Nernst Eşitliği uyarınca analit derişiminin logaritması ile orantılıdır (Ayrancı 2013). Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler pH veya tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, karbondioksit ya da amonyağa duyarlı elektrotlar ve anyon ya da katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlardır (Yücel 2013).

1.2.3.4b. Kondüktometrik biyosensörler

Kondüktometrik biyosensörler mikro elektrotlardan oluşmuş kapasitörlerdir. Kondüktometrik biyosensörlerde ölçüm analitin seçici ajana bağlanmasıyla immobilize filmin iletkenliğinin değişmesine dayanmaktadır. İmmobilize filmin iletkenliğinin değişmesi analit derişimi ile orantılı akımın oluşmasına sebep olmaktadır (Çatalkaya 2011).

1.2.3.4c. Amperometrik biyosensörler

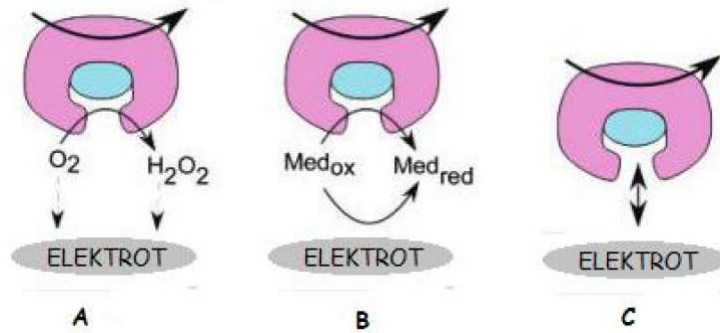
Genel olarak sabit bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alan sensörler amperometrik biyosensör olarak sınıflandırılır. Çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin derişimlerinin bir fonksiyonu olarak akım şiddeti takip edilir. Analitin yapısına göre çalışma elektrodun anot veya katot olarak kullanılabilir. Örnek olarak glikoz oksidaz enzimi ile hazırlanmış glikoz biyosensörü verilebilir, glikozun oksidasyonu süresince tüketilen oksijen izlenebileceği gibi enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojenperoksitin takibi de mümkün

olabilmektedir (Timur 2001). Amperometrik biyosensörler, potansiyometrik olanlara göre daha hızlı, hassas, kesin ve doğrudur. Amperometrik sensörlerin seçiciliği var olan elektroaktif türlerin redoks potansiyelleri dikkate alınarak artırılabilir.

Enzim tabanlı amperometrik biyosensörler medyatörün yapısına ve enzimin immobilizasyon yöntemine bağlı olarak birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılabilirler (Şekil 1.11.) (Castillo 2004).

Birinci nesil biyosensörlerin temeli, enzimatik reaksiyonlar sırasında tüketilen ya da oluşan türlerin ölçümüne dayanmaktadır. Birinci nesil biyosensörlerde yüksek potansiyel uygulaması bir dezavantajdır. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak için *ikinci nesil biyosensörlerde* küçük redoks aktif moleküller olan, enzimin aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasında elektron transferini sağlayan aracılardan (medyatör) kullanılmasıyla aşılmaktadır. Medyatörler, metallerin organik veya inorganik kompleksleri, organik maddeler ve polimerler olabilmektedir. Medyatörlere örnek olarak ferrosen türevleri, ferrosiyanid, iletken organik tuzlar ve kinonlar verilebilmektedir.

Üçüncü nesil biyosensörlerde medyatörsüz olarak enzimin aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transfer doğrudan olarak gerçekleşmektedir. Bu sistemde enzimin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında direkt bir etkileşim bulunur ve substrat enzim sayesinde ürüne dönüşürken doğrudan elektron transferi gerçekleşir.



Şekil 1.11. Amperometrik enzim elektrodu sınıfları **a)** I. Nesil Amperometrik elektrotlar; **b)** II. Nesil Amperometrik elektrotlar; **c)** III. Nesil Amperometrik elektrotlar (Wang 2008)

1.2.4. Amperometrik biyosensörlerin analitik performanların değerlendirilmesi

Hazırlanan biyosensörün belirlenen hedefler için kullanılabilmesi için uygun performans faktör testlerini geçmesi gerekmektedir. Bu sebeple biyosensörlerde tayin aralığı, gözlenebilme sınırı, duyarlılık, kullanım kararlılığı, seçicilik, cevap süresi ve raf ömrü gibi performans parametreleri takip edilir.

1.2.4.1. Doğrusallık ve tayin aralığı

Hücre içerisine eklenen analit miktarına karşı denge halindeki akımın ölçülmesi ve analit derişimine karşı grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon grafiği elde edilir. Bu grafikte

analit derişimi ile biyosensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu aralığa doğrusal çalışma aralığı denir. Biyosensörün kullanılabilmesi için analit derişiminin biyosensör cevabının doğrusal olduğu derişim aralığında olması gerekir (Çolak 2014). Biyosensörün analit derişiminin doğru ve kesin olarak ölçebildiği aralık tayin aralığı olarak tanımlanmaktadır. Bahsi geçen aralık kalibrasyon grafiği ile belirlenen doğrusal aralığın üst ve alt sınırıdır (Yücel 2013). Biyosensörün doğrusal çalışma aralığının geniş olması numunenin seyreltilmesi gibi ön işlemler yapılmadan analizin gerçekleşmesini sağlar.

1.2.4.2. Gözlenebilme sınırı (LOD)

Gözlenebilme sınırı (limit of dedection (LOD)) bir biyosensörle belli bir güven seviyesinde rapor edilebilir en küçük derişim değeri olarak adlandırılır. LOD “ $3 s/m$ ” formülü ile verilir. Burada “m” analit için hazırlanmış kalibrasyon grafiğinin tayin aralığındaki eğimini, “s” aynı derişimdeki analitin biyosensör hücresine eklenmesiyle okunan cevaplar arasındaki standart sapma değerini verir (Skoog 2004). Düşük LOD biyosensör için bir avantajdır. Gözlenebilme sınırı, elektrot tipi ve yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin analite karşı ilgisi ve biyolojik materyalin immobilizasyonunda kullanılan polimerin cinsi ve kalınlığına bağlıdır.

1.2.4.3. Duyarlılık

Hücre ortamına eklenen analit derişimi ile elde edilen akım değerleri içeren kalibrasyon eğrisinin eğiminin büyüklüğünün elektrot yüzey alanına bölünmesiyle biyosensörün duyarlılığı bulunur. Duyarlılık arttıkça ortama eklenen az bir analit miktarındaki değişmeyi tanıyabilme kabiliyetini artırırken, LOD değerini de düşürmektedir.

1.2.4.4. Kullanım kararlılığı

Bir biyosensörde kullanım kararlılığı çalışması, aynı koşullar altında aynı analit derişimi ile art arda ölçüm yapılması ve kararlı haldeki değerlerin standart sapmasının hesaplanmasını içermektedir. Kullanım kararlılığının değerlendirilmesinde standart sapma, varyans ve varyans katsayısı olarak üç ölçüt kullanılmaktadır (Skoog 2004).

Kararlılığın yüksek olması iş gücü ve ekonomik açıdan avantaj sağlamaktadır. Enzim sensörünün kararlılığını; pH, sıcaklık, nem, matrisin özellikleri (Çolak 2014) ve enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi etkilemektedir (Baş 2011).

1.2.4.5. Seçicilik

Biyosensörün seçiciliğinin yüksek olması, biyomolekülün hedef analite karşı duyarlı olması ve ortamda bulunabilecek diğer maddelerden etkilenmemesi anlamına gelmektedir. Seçici bir biyosensör kompleks bir matriks içerisinde yalnızca istenilen analite duyarlı olmalıdır. Aksi durumda özellikle gerçek numune analizinde analit derişiminin tayininde hata oluşur.

1.2.4.6. Raf ömrü

Biyomolekülün aktivitesindeki değişimin bir ölçüsü olarak raf ömrü tanımlanmaktadır. Biyosensörün normal şartlar altında duyarlılığını koruyabildiği uzun bir kullanım ömrüne sahip olması önemli bir özelliktir. Uygun çalışma ve saklanma koşullarının oluşturulması biyosensörün aktivitesinin korunmasını ve biyosensörün raf ömrünün uzun olmasını sağlar. Bir biyosensörün raf ömrü incelenirken biyosensörün optimum koşullarda belirli günlerde hücre içerisinde dengeye geldikten sonra kalibrasyon grafiğinde doyumluğa yakın bir derişimde substratın eklenmesiyle elde edilen kronoamperometrik cevaplar kaydedilir. Elektrodun bekletme süresine karşı kronoamperometrik akımlar grafiğe geçirilir ve bu grafikten ölçülen kronoamperometrik cevapların değişimleri kullanılarak biyosensörün aktivitesindeki azalma hesaplanmaktadır.

1.2.5. Amperometrik biyosensörlerin avantaj ve dezavantajları

Biyosensörlerin yüksek spesifikliklerinin yanında, renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında doğrudan ölçmeye olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır.

Biyosensörlerin gerçek zamanlı ve yerinde takip etme olasılığı, uzun işlem basamakları gerektirmemesi, ucuz, hızlı, yüksek seçicilik, düşük miktarları tayin edebilmesi, minyatürize edilebilmesi, renkli ve bulanık çözeltilerde doğrudan ölçülebilmesi, aynı anda birden fazla analiti ölçebilmesi, üretimin kolay olması, hastanın kendi ölçümüne olanak sağlaması ve portatif tayine uygun olması diğer analitik tekniklere göre avantajlarıdır. (Dorst 2010; Şahin 2014). Dezavantajları ise, biyobileşenin membran yüzeyinden geçebilen maddelerden etkilenmesi, biyobileşenin (enzim, hücre, antikor, vb.) kararlılığının ortam şartlarından (pH, sıcaklık, vb.) etkilenmesi, biyobileşenin denatürasyonundan dolayı ısı ile sterilize edilememesi ve biyoyoumluluk olarak sıralanabilmektedir (Çolak 2014).

1.3. Enzimler

Enzimler proteinlerden oluşmuş biyolojik olarak aktif ve oldukça spesifik katalizörlerdir. Enzimlerin önemli özelliği, katalizör olarak katıldıkları tepkime türlerine ve substratlara karşı seçici davranmalarındır. Bundan dolayı enzimler hücre içinde tepkimelerin hızlı ve yan ürün oluşturmada gerçekleşmesini sağlarlar. Enzimlerin reaksiyonları hızlandırmasına örnek verilmesi gerekirse, üreinin NH_3 ve CO_2 'e parçalandığı tepkimenin hız sabiti $3,0 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ olmasına rağmen üreaz enzim varlığında hız sabiti $3,0 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Üreaz enzimi bu tepkimenin 10^{14} kat daha hızlı gerçekleşmesini sağlamıştır (Beskan 2011, Çolak 2014). Katalizledikleri tepkimenin türüne göre enzimler altı ana grupta incelenmektedir.

Oksidoredüktazlar : İki substrat arasındaki redoks (yükseltgenme, indirgenme) reaksiyonlarını kataliz ederler. Bu gruba dehidrogenaz, oksidaz, redüktaz, transhidrogenaz ve hidroksilaz enzim türleri girmektedir.

Transferazlar : Bir atom grubunun veya molekülün diğer moleküle aktarılmasını sağlarlar. Yani moleküller arası grup transferini katalizlerler.

Hidrolazlar : Ester, eter, peptit, C-C, P-N bağlarının hidrolizini katalizlerler.

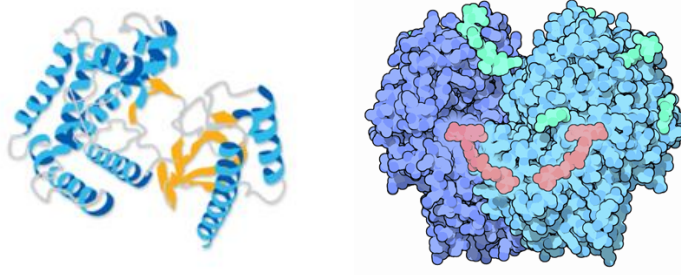
Liyazlar : Hidroliz dışındaki mekanizmalar ile substratlardan bazı grupların çıkışını sağlayan enzim türleri bu gruba girer. Genellikle, C-C, C-O, C-N, C-S bağlarına etki ederler. Çift bağ oluşum ve katılma reaksiyonlarını katalizlerler.

İzomerazlar : Moleküldeki izomerleşme reaksiyonlarını sağlayan enzimlerdir.

Ligazlar : Bu enzim türleri ATP'de bulunan pirofosfat bağının parçalanmasına bağlı olarak meydana gelen enerji ile iki molekülün birbirine bağlanmasını, yani moleküllerin sentezlenmesi reaksiyonları kataliz ederler (Baş 2011; Telefoncu 2012).

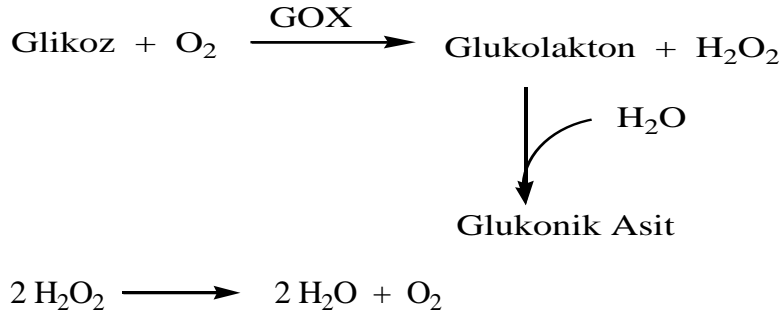
1.3.1. Glikoz oksidaz (GOX) enzimi

1904 yılında Maksimow tarafından glikoz oksidaz (GOX) enzimin aktivitesi *Aspergillus niger*'de saptanmasına rağmen ilk olarak 1952 yılında enzim ticari olarak üretilmeye başlanmıştır (Uçan 2015). Glikoz oksidaz enzimi kaynağı olarak ilk başlarda *Penicillium notatum* ve *Penicillium glaucum* kullanılmasına rağmen günümüzde *Aspergillus niger* ve *Penicillium amagasakienese* kullanılmaktadır (Özyılmaz 2005). Glikoz oksidaz yaklaşık olarak 130 ile 175 kDa arasında molekül ağırlığına sahiptir.



Şekil 1.12. Glikoz oksidazın yapısı

Glikoz oksidaz, glikozun oksijen ile yükseltgenip glukono- δ -lakton ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) oluşmasını sağlayan enzimdir. Enzim katalizörlüğünde glikozun yükseltgenmesiyle oluşan lakton sulu ortamda hidroliz olarak glukonik aside dönüşür. GOX β -D-glikoz için oldukça spesifiktir. Reaksiyon Şekil 1.13’de gösterildiği gibidir. Reaksiyon sırasında indirgenmiş olan GOX oksijen tarafından yeniden yükseltgenir ve hidrojen peroksit oluşur (Bankar 2009; Çolak 2014). Oluşan hidrojen peroksit ya kendiliğinden yada dıştan bir etki ile su ve oksijene dönüştürülür.

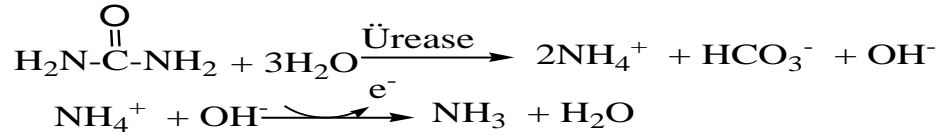


Şekil 1.13. Glikoz oksidaz enziminin işleyiş mekanizması

Glikoz oksidaz enzimi bulunduğu ortamdaki oksijeni kullandığından endüstriyel olarak yiyeceklerin raf ömürlerinin uzatılmasında, tatlarının ve renklerinin korunmasında, pişirme işlemlerinde, şarap yapımında, biyoyakıt hücrelerinde kullanılmaktadır. Sağlık ve endüstriyel sektörde idrar, kanda ve gıdalarda glikoz tayini için glikoz oksidaz kullanılmaktadır. Enzim katalizörlüğünde hidrojen peroksit oluştuğundan, antibakteriyal ve antifungisit olarak da kullanılmaktadır (Wong 2008; Bankar 2009).

1.3.2. Üreaz enzimi

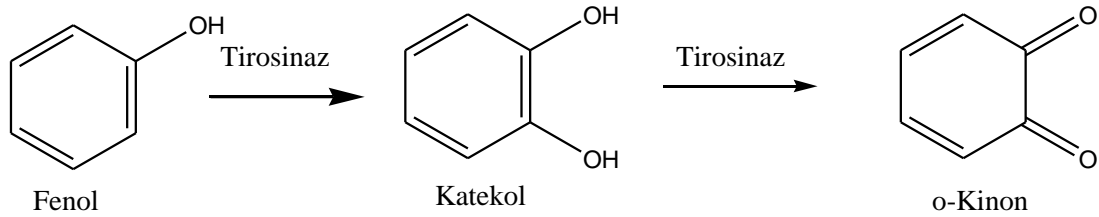
James B. Summer 1926 yılında üreaz (urea amidohidrolase EC 3.5.1.5) enziminin kristallerini elde ederek, enzimin çoğunun protein olduğunu kanıtlamıştır. Vücutta bağırsak bakterileri tarafından salınan üreaz sadece üreye etki etmektedir. Üreyi amonyak ve karbondioksite hidrolize eden üreaz, nikel içeren bir enzimdir. Enzimlerin hidrolazlar grubunda bulunan üreazın etki mekanizması aşağıdaki gibidir (Şekil 1.14.).



Şekil 1.14. Üreazın etki mekanizması

1.3.3. Polifenol oksidaz (PPO) enzimi

Tirosinaz enzimi 1856 yılında Schobenbein tarafından mantar içinde keşfedilmiştir. Bakır içeren bir enzim olan tirosinaz enzimlerin oksidoredüktaz grubundandır. Tirosinaz enzimi hem fenollerı o-difenollere dönüştürerek monofenolaz aktivitesi hem de o-difenolleri o-kinonlara dönüştürerek difenolaz aktivitesine sahiptir. Bu enzim muz, patates, mantar, avakado ve elmada bulunmaktadır. Tirosinaz enzimi genelde şarap, bira, meyve sularında ve atık sularda fenolik bileşiklerin analizlerinde kullanılmaktadır (Çil 2016). Nötr tampon ve oda sıcaklığında kararlı olan tirosinaz, fenolleri katalizlemektedir. Şekil 1.15’de tirosinaz enziminin işleyiş mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 1.15. Tirosinaz enziminin işleyiş mekanizması

1.3.4. Enzim kinetiği

Leonar Michaelis ve Maud Menten isimli araştırmacılar, enzim varlığında gerçekleşen reaksiyonlar için reaksiyon hızı ile substrat derişimi arasındaki ilişkiyi tanımlamışlardır. Tek substratlı reaksiyonlar için geçerli olan bu model, enzim kinetiklerinin kantitatif analizleri için geliştirilmiştir. Bu modele göre tersinir olarak sabit bir hızla substratla [S] birleşen enzim [E], önce enzim-substrat [ES] kompleksini oluşturur. [ES] kompleksi daha sonra ya sabit bir hızla yeniden E ve S’a dönüşür ya da ileri yönde sabit hızla ürün [Ü] oluşurken enzim de serbestleşerek temel haldeki yapısına döner. Bu olayda hızı kısıtlayan enzimdir. Tepkime koşulları ve enzim derişimi sabit iken tepkime maksimum hıza ulaştıktan sonra substrat derişimi artırılırsa bile tepkime hızı değişmez. Bu da enzimin enzim-substrat kompleksinin oluşumunda kısıtlayıcı rol oynamasından kaynaklanmaktadır. Aşağıdaki şekil 1.16’da Michaelis- Menten hiperbolik grafiği ve bu grafikten türetilmiş Lineweaver-Burk eğrisi gösterilmektedir.



ES kompleksinin oluşum ve parçalanma hızı aşağıdaki gibidir:

$$\vartheta_{[ES]Oluşum} = k_1[E][S] \quad (3.1)$$

$$\vartheta_{[ES]Parçalanma} = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (3.2)$$

Denge anında [ES] nin oluşumu ve parçalanma hızı aynı olduğundan,

$$k_1[E][S] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

düzenleme yapılırsa,

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_2 + k_3} \quad (3.3)$$

şeklinde olur.

$$\text{Toplam hız eşitliği(3.4.); } V = k_3 [ES] \quad (3.4)$$

ve ortamdaki serbest enzim miktarı aşağıdaki gibidir.

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (3.5)$$

3.3 ve 3.5 eşitlikleri denklem 3.4'te yerine konulduğunda [ES],

$$[ES] = \frac{k_1 ([E_0] - [ES])[S]}{k_2 + k_3} \quad (3.6)$$

$$[ES] = \frac{k_1 [S][E_0]}{k_1 [S] + k_2 + k_3} \quad (3.7)$$

halini alır. Buna göre tepkime hızı v,

$$\vartheta = k_3 [ES] = \frac{k_3 k_1 [E_0][S]}{k_1 [S] + k_2 + k_3} = \frac{k_3 [E_0][S]}{[(k_2 + k_3)/k_1] + [S]} = \frac{k_3 [E_0][S]}{K_m + [S]}$$

olur. $K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$ olarak alınır,

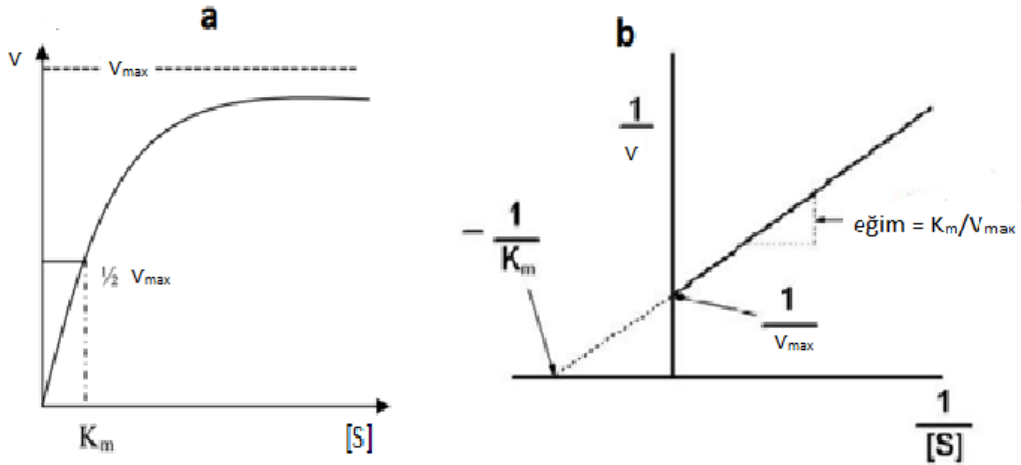
Buradaki tepkime hızı [S] \gg K_m olduğunda maksimum olur dolayısı ile,

$$U_{\max} = k_3 [E_0] \text{ olur,}$$

Tepkime hızı;

$$\vartheta = \frac{\vartheta_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Michaelis-Menten Eşitliği} \quad (3.8)$$

olarak elde edilir. Bu eşitlik Michaelis-Menten eşitliği olarak bilinir. Bu eşitliğe göre hızın substrat derişimine göre değişimi Şekil 1.16'daki gibidir.



Şekil 1.16. a) Michaelis-Menten eğrisi; **b)** Lineweaver-Burk grafiği

Michaelis-Menten eşitliği hiperbolik olmasından dolayı karakteristik noktaları belirlemek güçtür. Bu sorunu çözmek için eşitlik tersine çevrilip yeniden düzenlenmiştir. Bu düzenleme sonucunda $1/[S]$ değerlerine karşılık $1/v$ değerleri grafiğe geçirilirse Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 1.16b) elde edilir. Bu grafiğin eğimi K_m/v_{max} olarak bulunur.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (3.9)$$

Elektrokimyasal olarak hız yerine akım(I) yazıldığından eşitlik 3.9 aşağıdaki şekilde düzenlenir.

$$\frac{1}{I} = \frac{K_m}{I_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{I_{max}} \quad (3.10)$$

K_m (Michaelis-Menten Sabiti): En yüksek hız (v_{max}) değerinin yarısına ulaşmak için gerekli substrat miktarıdır. K_m değerini tam olarak bulabilmek için farklı derişimlerde substrat kullanılmalıdır. K_m , enzimin substratına ilgisini (affinitesi) gösteren, enzim-substrat ilişkisinde bir ölçüdür. K_m değeri düşük olan bir enzim, substratına yüksek ilgi (affinite) gösterdiğini ve düşük substrat derişiminde doygunluğa ulaştığını belirtir. Büyük K_m ise enzimin substratına ilgisinin az olduğunu göstermektedir ve mol/L biriminde ifade edilir.

1.3.5. Enzim immobilizasyon yöntemleri

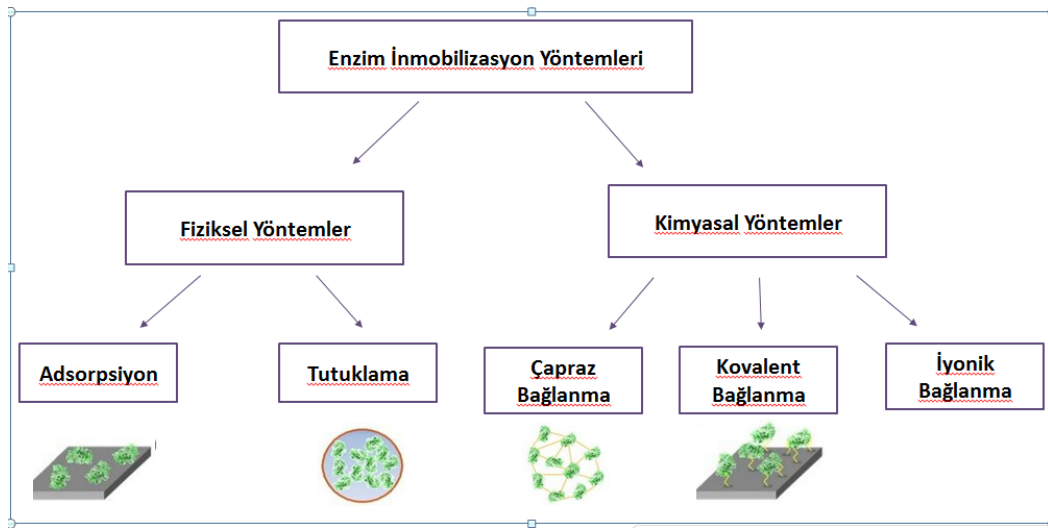
Enzimlerin serbest olarak kullanıldığı çalışmalarda, enzimin reaksiyon ortamından uzaklaştırması güç olduğundan reaksiyonun kontrolü çok zor olur ve enzimler yeniden kullanılamaz hale gelirler. Ayrıca, endüstriyel atık olarak doğaya serbest halde bırakılan enzimler pek çok yan etki yapabilirler. Enzimlerin pahalı olması ve serbest enzimin tüm bu dezavantajlarını ortadan kaldırmak için enzimin immobilize edilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonu, enzimlerin aktif bölgelerini muhafaza ederek, sürekli olarak kullanılması amacıyla çeşitli matrislere bağlanmasıyla hareketinin sınırlandırılma işlemidir. Biyomolekülün kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre uygun

immobilizasyon yöntemi belirlenmektedir. Enzimler, suda çözünmeyen polimerlerde tutuklanarak, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak immobilize edilebilirler.

İmmobilize enzimin avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir olması,
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı daha dayanıklı olması,
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir olması,
- Sürekli sistemlere uygulanabilir olması,
- Doğal enzime göre daha kararlı olması,
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygun olması.

Enzim immobilizasyon yöntemleri fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. Fiziksel immobilizasyon yöntemi adsorpsiyon ve tutuklama olmak üzere iki ana sınıfta incelenirken, kimyasal immobilizasyon yöntemi iyonik, kovalent ve çapraz bağlama olarak sınıflandırılır.



Şekil 1.17. Enzim immobilizasyon yöntemleri

1.3.5.1. Adsorpsiyon yöntemi

Bu yöntemle biyobileşenin film veya tabaka yüzeyine adsorbe edilmesi sağlanır. Enzimin taşıyıcıya bağlamada Van der Waals kuvvetleri etkilidir (Özyılmaz 2005). Adsorpsiyon immobilizasyonunun en büyük dezavantajı adsorbe olan biyobileşenin hızla desorbe olmasıdır. Desorpsiyondan dolayı biyosensörün raf ömrü genel olarak çok kısa olmaktadır.

1.3.5.2. Tutuklama (Hapsetme) yöntemi

Biyobileşenin bir tabaka içerisinde hapsedilmesi ile enzim bulunduğu yerden dışarıya çıkamaz. Bu yöntemde enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmaz. Enzimler, organeller, hücreler ve antikorlar polimer jel tabakalarda veya diyaliz membranlarda tutuklanabilirler

1.3.5.3. İyonik bağlama yöntemi

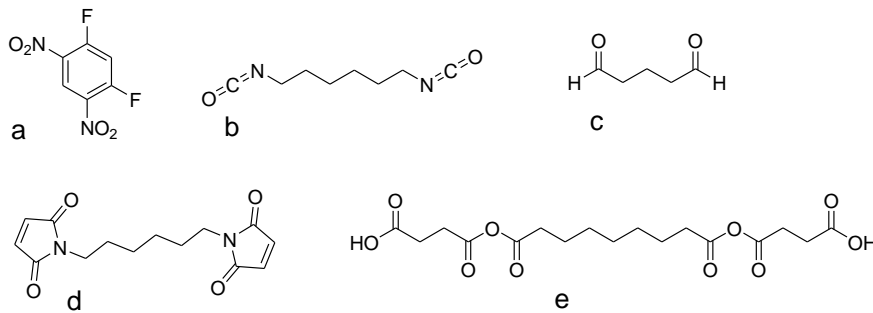
Bu yöntemin temeli, iyon değişirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanmasıdır. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından aktivitesini kısa sürede kaybettiği bilinmektedir.

1.3.5.4. Kovalent bağlama yöntemi

Kovalent bağlanmada en önemli husus taşıyıcı ile enzim arasındaki bağlanmanın aktif merkezde bulunan amino asitler ile oluşmamasıdır. Bu durum amino asitlerin enzim aktivitesi için önemli olması ve analit ile etkileşmesine sterik olarak engel oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir.

1.3.5.5. Çapraz bağlama yöntemi

Çapraz bağlama yöntemi tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Bu yöntemde, küçük moleküllü iki veya daha çok fonksiyonel grupları olan reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler meydana getirirler. Çapraz bağlayıcı olarak iki fonksiyonlu reaktiflerden gluteraldehit, heksametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen, bis maleimidohekzan, disüksinilsüberat en çok kullanılmaktadır (Şekil 1.18.). Çapraz bağlanma yöntemi, biyobileşen ve reaktif derişimine, pH'a ve immobilize edilecek biyobileşenin özelliklerine bağlıdır (Özyılmaz 2005). Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antijenlerin immobilizasyonunda da uygulanabilir.



Şekil 1.18. Sıklıkla kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar **a)** diflorodinitrobenzen; **b)** heksametilen diizosiyanat; **c)** gluteraldehit; **d)** 1,6-bis(maleimido)hekzan; **e)** disüksinilsüberat

2. KAYNAK TARAMASI

Guilbault ve Lubrano 1973 yılında kan şekerinin amperometrik olarak serbest hidrojen peroksitin belirlenmesine dayanan bir enzim elektrodu tarif etmişlerdir (Guilbault 1973).

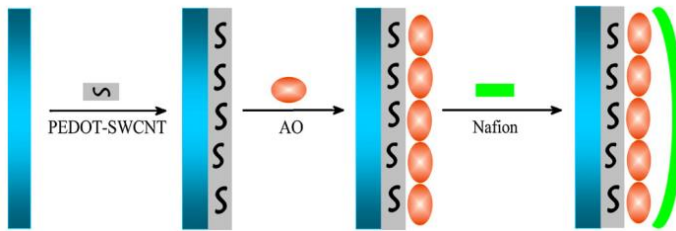


1980'lerde biyosensörlerin popüler hale gelmesiyle biyoteknoloji alanındaki gelişmeleri tetiklemiştir (Wang 2001). 1986'da Foulds ve Lowe platin elektrot yüzeyine GOX varlığında elektropolimerizasyon yöntemi ile polipirol kaplamışlardır. Pt/PPy/GOX biyosensörün 0,7 V uygulama potansiyelinde 0,5 - 10 mM aralığında doğrusal davranış göstermiştir. Biyosensörün raf ömrü 21 gün olarak tespit edilmiştir (Foulds 1986). Daha sonraları polianilin, politiyofen, poli(3,4-etilendioksitiyofen) gibi iletken polimerler biyosensörlerin yapımında kullanılmışlardır (Guimard 2007).

2005 yılında Pan ve arkadaşları GOX tabanlı poliaminofenol ve karbon nano tüp (CNT) kompozit biyosensörü yapmışlardır. CNT'nin yüksek yüzey alanı ve mükemmel elektriksel iletkenliklerinden dolayı Au/POAP/CNT/GOX elektrodu gözlenebilir sınırlı (LOD) 0,01 mM olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, biyosensör hızlı cevap süresi ve geniş cevap akımı oluşturmuştur (Pan 2005; Malhotra 2006).

2006 yılında Nien ve arkadaşları PEDOT tabanlı glikoz biyosensörü yapmışlardır. Pt/PEDOT/GOX biyosensörü 0,35 V uygulama potansiyeli ile 0,1 – 10 mM aralığında doğrusal davranış göstermiş olup, LOD 0,13 mM olarak tespit edilmiştir. Biyosensörün raf ömrü 18 gün olarak tespit edilmiştir (Nien 2006)

Ming ve arkadaşları PEDOT ve CNT tabanlı Pt/PEDOT/CNT/AO/Nafion L-askorbik asit biyosensörü yapmışlardır (Şekil 2.1.). Bu biyosensör 0,4 V uygulama potansiyeli ile 0,001-18 mM doğrusal aralıkta 28,5 mA M⁻¹cm⁻² duyarlılığa sahip iken Pt/PEDOT/AO ise 19,5 mA M⁻¹cm⁻². LOD değeri sırasıyla 0,7 ve 1,53 µM olup, K_m 18,35 mM olarak hesaplanmıştır. Bu biyosensör için yapılan raf ömrü çalışmasında 60 gün sonunda %75 aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.(Ming 2011)



Şekil 2.1. Askorbik asit biyosensörünün hazırlanışı (Ming 2011)

Polipirol ve politiyofen türevlerinin avantajlı özelliklerinden dolayı bu iki yapıyı da barındıran iletken polimerler sentezlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bu tip polimerler arasında SNS türevleri düşük oksidasyon potansiyeli, üstün elektriksel ve optik özellikleri ve kolay polimerleşebilmeleri gibi avantajları nedeni ile öne çıkmaktadır. Bugüne değin yapılan biyosensör çalışmalarında bazı PSNS türevi kullanılmıştır.

Tuncagil ve arkadaşları platin elektrot yüzeyine P(SNS-NO₂) ile modifiye ettikten sonra pirol varlığında tirozinaz enzimi immobilize edilmesiyle fenol biyosensörleri hazırlamışlardır. Pt/ P(SNS-NO₂)/PPy/PPO biyosensörün -0,7 V uygulama potansiyeli ile katekol ve L-tirosin substratları için biyosensörün analitik özellikleri incelenmiştir. Biyosensörün katekol ve L-tirosin substratları için sırasıyla 0,05-0,5 mM 0,8-2,5 mM aralığında doğrusal davranış gösterdiği tespit edilmiştir. Biyosensörün raf ömrü katekol ve L-tirosin substratları için sırasıyla 35 ve 60 gün olarak tespit edilmiştir (Tuncagil 2010).

Tuncagil ve arkadaşları diğer bir çalışmada grafit çubuk yüzeyini P(SNS-An) ve altın nano partikülleri ile modifiye ettikten sonra glikoz oksidaz enziminin immobilize edilmesiyle GE/CP/AuNP/GOx glikoz biyosensörü oluşturmuşlardır. GE/CP/AuNP/GOx biyosensörünün analitik performanslarını Ag/AgCl referans elektroduna karşı -0,7 V uygulama potansiyelinde incelemişlerdir. Bu inceleme sonucunda biyosensör 0,002-5,0 mM aralığında doğrusal davranış gösterdiği ve gözlenebilirlik sınırı (LOD) 0,0021 mM olduğu tespit edilmiştir. Bu modifiye elektrot ile bazı meyve sularındaki glikoz miktarları test edilmiş ve başarılı olarak rapor edilmiştir (Tuncagil 2011).

Özdemir ve arkadaşları karbon pasta elektrot yüzeyine 4-(2,5-di(tiyofenil-2-il)-1H-pirol-1-il)benzenamin (SNS-An) elektropolimerizasyon yöntem ile kaplamışlardır. İletken polimer kaplı elektrot karbon nanotüp modifiye edildikten sonra glikoz oksidaz enzimi immobilizasyonu ile CPE/P(SNS-An)/CNT/GOX glikoz biyosensörü tasarlanmıştır. Bu biyosensör -0,7 V uygulama potansiyeli ile 0,1-2,0 mM aralığında doğrusal davranış göstermiştir. Ayrıca, bazı meyve sularında başarılı bir şekilde test edilmiştir (Özdemir 2011).

Kanık ve arkadaşları pestisit tayini için grafit elektrot ve poli(SNS-An) kullanılarak asetilkolinesteraz enzimi ve kolin oksidaz enzimi ile GE/P(SNS-An)/AChE-ChO biyosensörü hazırlamışlardır. Biyosensör -0,7 V uygulama potansiyelinde 0,12-10 mM aralığında doğrusal davranış göstermiş olup, LOD 0,11 mM olarak tespit edilmiştir. Biyosensörün raf ömrü 4 hafta olarak tespit edilmiş ve paraokson-etil pestisitinin tayininde kullanılmıştır (Kanık 2013).

Güler ve arkadaşları 4-amino-N-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benzamid (HKCN) kullanılarak piranoz oksidaz enzimi ile GE/HKCN/PyOx glikoz biyosensörleri hazırlamışlardır. Bu biyosensör -0,7 V uygulama potansiyeli ile kesik sistemde ve akışkan sistemde 0,05-1,0 mM ve 0,01-1,0 mM aralığında doğrusal davranış göstermiştir. Gerçek numune analizi için hazırlanan biyosensörler ile metal ve karton kutulu bazı meyve sularındaki glikoz miktarı tayin edilmiştir. Analiz sonuçları ile spektrofotometrik yöntemle elde edilen değerlerle karşılaştırmış ve biyosensörün başarılı olduğunu rapor edilmiştir (Güler 2014).

Soğancı ve arkadaşları ferrosenilditiyofosfonat (TPFc) ve 4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)bütan-1-amin (TPA) içeren bir kopolimer ve glikoz oksidaz enzimi ile GE/P(TPFc-co-TPA)/GOX glikoz biyosensörünü tasarlamışlardır. Bu biyosensör +0,45 V uygulama potansiyeli ile 0,075-75 mM aralığında doğrusal davranış göstermiş olup, duyarlılığı ve LOD değeri 0,1 µA/mM ve 0,03 mM olarak tespit edilmiştir. Ayrıca biyosensörün bazı meyve sularında glikoz için başarılı bir şekilde kullanılabilceğini rapor edilmiştir (Soğancı 2014).

Kesik ve arkadaşları grafit çubuk yüzeyine P(SNS-NH₂) ve karbon nanotüp modifiye ettikten sonra asetilkolinesteraz enziminin immobilize ettirmesiyle pestisit tayini için, GE/P(SNS-NH₂)/CNT/AChE–ChO biyosensörü tasarlamışlardır. Biyosensör +0,1 V uygulama potansiyeli ile 0,05-8,0 mM aralığında doğrusal davranış göstermiş olup ve LOD 0,09 mM olarak tespit edilmiştir. Hazırlanan biyosensör ile suda pestisit tayini yapmışlardır. Biyosensörün raf ömrünü 45 gün olduğu tespit edilmiştir (Kesik 2014).

Ayrancı ve arkadaşları, 4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il) amidoferrosenilditiyo-fosfonat ve 4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benzenamin içeren bir kopolimer ile glikoz oksidaz enzimi ile GE/P(SNS-NH₂–ko- SNS-NH₂–Fc)/GOx glikoz biyosensörü tasarlamışlardır. Bu biyosensör 0,45 V uygulama potansiyeli ile 0,5-5,0 mM aralığında doğrusal davranış göstermiş olup, LOD 0,18 mM olarak tespit edilmiştir. Biyosensörün bazı meyve sularının glikoz tayininde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini rapor edilmiştir (Ayrancı 2015).

Derviseviç ve arkadaşları, SNS-NH₂ ve di-amino-ferrosen (DAFc) monomerleri tabanlı PGE/P(SNS-NH₂)/P(DAFc)/Üreaz üre biyosensörü geliştirmişlerdir. Ürenin substrat olarak kullanıldığı kronoamperometrik çalışmalar sonucunda 0,1-8,5 mM doğrusallık aralığında 0,54 µA/mM duyarlılık bulunmuştur. LOD değeri 12 µM olan biyosensör kan ve idrarda üre tayinine olanak sağladığını bildirilmiştir (Derviseviç 2017).

Tekbaşoğlu ve arkadaşları, 4-amino-N-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benz amid(HKCN) ve 1,3-Bis(2-piridilimino)isoindolin 3,4-etilendioksitiyofen palladyum kompleksi (EDOT-PdBPI) P(EDOT- PdBPI-co-HKCN)/GOx ile -0,7 V sabit potansiyel ile 0,25-2,5 mM doğrusal aralığında 10,871 µA duyarlılık ve LOD değeri 0,176 mM olarak bulunmuştur. Raf ömrü için 8 hafta sonunda %87 cevap verdiğini ve real analiz sonuçları ile biyosensörün başarılı olduğunu rapor edilmiştir. (Tekbaşoğlu 2017)

Literatürde iletken polimerlerin amperometrik biyosensörlerde kullanımı ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına karşın hazırlanan sensörlerin seçiciliği, duyarlılığı, ölçüm aralığı, kararlılığı, gözlenebilme sınırı ve raf ömrü gibi önemli özellikleri ticari, güncel uygulamalarda yer bulabilecek nitelikte olmadığından yeni biyosensörlerin üretimi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Son dönemde yapılan çalışmalar, gelişmiş özelliklere sahip biyosensörlerin hazırlanabilmesinin uygun niteliklere sahip yeni polimerler matrislerinin kullanılmasına bağlı olduğunu ortaya koymuştur.

Tez çalışmasının amacı poli(2,5-ditiyeniilpirol) (PSNS) ve polipirol (PPy) tabanlı, literatürde bulunmayan çeşitli biyosensörlerin hazırlanması, bu biyosensörlerin özelliklerinin incelenmesi, optimizasyonu ve gerçek numunelerde analiz yapılmasıdır. Yapılan bu çalışma ile glikoz, fenol türevleri ve üre gibi insan sağlığına olumsuz etkileri sebebi ile kontrol altında tutulması gereken bileşiklerin kolay, yüksek hassasiyetli bir yöntem ile analizine olanak sağlanması hedeflenmiştir. Bu noktada kullanılması planlanan PSNS ve PPy türevi iletken polimer matrisler hedefe yönelik tasarlanmış olup, polimer yapısı ile biyosensör özellikleri arasındaki ilişkinin ortaya koyulması planlanmıştır. Ayrıca kopolimerizasyon, medyatör kullanımı, takip edilen bileşen türünün hazırlanan biyosensörlerin analitik performanslarına etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Glikoz oksidaz (GOX, EC 1.1.3.4. Aspergillus niger, Type X-S, 128 U/mg), Tirosinaz (PPO, mushroom, 2687 U/mg), glikoz, üre, katekol (1,2 dihidroksibenzen), askorbik asit, fruktoz, hidrojen peroksit ve çok duvarlı karbon nanotüp(CNT(O.DxL 6-9 nm x 5µm, >%95 karbon) Sigma-Aldrich'den satın alınmıştır. Üreaz (Jack beans) Alfa Aesar firmasından temin edilmiştir.

Sakkaroz ve sitrik asit Analar firmasından, ürik asit Across, laktik asit ABCR, HCl, NaOH, monosodyum hidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfat Merck firmasından temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Çözeltiler

Hidrojen peroksit: % 35'lik $\delta=1,13$ kg/L olan hidrojen peroksitten belirli bir miktar alınarak derişimi 1 M olacak şekilde 100 mL stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra gerekli görülen derişimlerde hidrojen peroksit çözeltileri suyla seyreltilerek hazırlanmıştır.

Fosfat tamponu: Monosodyum hidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfat belli miktarlarda tartılarak saf suda çözülmüş, hazırlanan çözeltinin pH' sı 1,0 M NaOH ve 1,0 M HCl ile ayarlanmış ve çözeltideki analitik derişimi 0,1 M olacak şekilde seyreltilmiştir. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için aynı yol izlenmiştir. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır.

Enzim çözeltileri: Stok enzimden hassas terazide gerekli olan miktar tartılarak birim içerisinde 5 Unit/µL olacak şekilde saf su ile ayarlanmıştır. Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra kullanılmayan enzim çözeltileri derin dondurucuda saklanmıştır.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı sodyum hidroksitten belli bir miktar alınıp saf suda çözülerek 0,1 M 100 mL çözeltisi hazırlanmıştır.

Hidroklorik asit çözeltisi: Derişik HCl' den belli bir miktar alınıp uygun şekilde seyreltilerek 0,1 M 100 mL HCl çözeltisi hazırlanmıştır.

Askorbik asit çözeltisi: Katı askorbik asitten 1 M, 1 mL balon jodede ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. Aynı şekilde girişim etkisi çalışması için fruktoz, sakkaroz, sitrik asit, ürik asit, laktik asit çözeltileri hazırlanmıştır.

Glikoz Çözeltisi: 1 mL balon jodede 1 M'lık çözeltisi hazırlanmıştır. Bu hazırlanan stok çözeltiden 0,4, 0,1 ve 0,02 M'lık çözeltiler hazırlanmıştır.

Üre Çözeltisi: Substrat olarak kullanılan üre 1 M'lık çözeltisi stok olarak hazırlanmıştır. Daha sonra gerekli miktarlarda seyreltilerek yeni çözeltiler hazırlanmıştır.

Katekol Çözeltisi: Katekol belli miktarda hassas terazide tartılarak 1 mL'lik balon jodede 1 M olacak şekilde her gün taze hazırlanmıştır. Bu hazırlanan çözeltiden 0,1 ve 0,02 M lık çözeltileri hazırlanmıştır.

3.3. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Elektrokimyasal çalışmalarda GAMRY Reference 600 Potansiyostat / Galvanostat elektrokimyasal analiz cihazı be Basi C3 standı kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışma düzeneği

Tampon çözeltilerinin pH'larının ölçülmesinde Mettler Toledo Model five easy pH-iyonmetre cihazı kullanılmıştır.

2,5 μL – 10 μL ve 100 μL çözelti ilaveleri için Eppendorf marka $\pm 0,05 \mu\text{L}$ hassasiyeti olan mikro pipetler kullanılmıştır. Yıkamada ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan saf su; millipure marka saf su cihazından sağlanmıştır.

Katıların çözelti içerisinde iyi çözünmesini veya dispers olmasını sağlamak amacıyla ultrasonik banyo olarak bandelin sonorex aleti kullanılmıştır.

Elektrokimyasal olarak sentezlenen iletken polimer filmlerin hem enzim immobilize edilmiş hem de enzim immobilize edilmemiş yüzeyleri SEM ile incelenmiştir. ITO elektrot yüzeyinde sentezlenmiş filmler çözücü ile birkaç kez yıkanarak üzerindeki destek elektrolitlerden temizlenmiştir. Bu filmlerin yüzeyleri Zeiss marka Leo 1430 model SEM cihazı ile yüzeylerinin analizi yapılmıştır. Enzim immobilize edilmiş filmler ise tampon çözelti ile yıkanarak immobilize olmamış enzimler ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

3.4. Hücre ve Elektrotlar

Elektrokimyasal işlemlerde Şekil 3.1’de gösterilen Basi C3 hücre standı ve üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Referans elektrot olarak Basi marka MF-2052 no’lu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak platin tel ve çalışma elektrotları olarak 0,25 cm² (0,5 cm x 0,5 cm) yüzey alanlı platin levha, platin disk ve camsi karbon elektrot (GCE) kullanılmıştır.

Platin disk, GCE elektrotları çıplak ve iletken polimer kaplı olarak çalışmalar yapılmıştır. Bu elektrotlar substrat olarak hidrojen peroksit için amperometrik çalışmalar sonucunda çalışma aralığının dar olması, tekrarlanabilirliğinin az olması ve sinyallerin düzgün olmamasından dolayı sonraki çalışmalarda çalışma elektrodu olarak platin levha elektrodu kullanılmıştır.

3.5. Platin Levhaların Temizlenmesi

Platin levhanın yüzeyi mekanik olarak temizlendikten sonra saf su ile yıkanıp ve aleve tutularak üzerindeki tüm safsızlıkların yanarak yüzeyden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elektrokimyasal olarak ise 0,5 M sülfürik asit içerisinde (-2,0 – 2,0 V) arasında 10 döngü uygulanarak temizlenmiştir. Daha sonra saf su ardından etanol ile yıkanmış, kurutulmuş ve tekrar saf su ile yıkanarak kaplamaya hazır hale getirilmiştir.

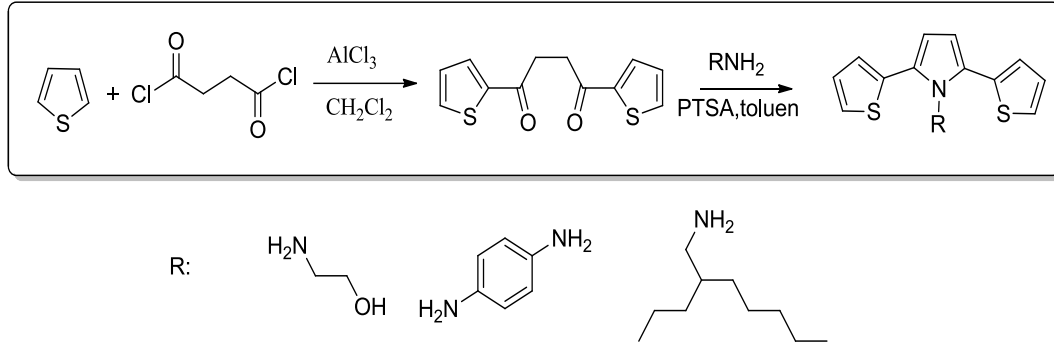
3.6. Tarama Hızı Çalışması

İletken polimer kaplı elektrot monomersiz elektrolit ortamında farklı tarama hızlarında (10, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100 mV/s vb.) dönüşümlü voltamogramları incelenmiştir. Polimerlerin yükseltgenme ve indirgenme potansiyelleri belirlenmiştir. Polimerin tarama hızı çalışmaları sonucunda anodik ve katodik pik şiddetleri tarama hızına karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.7. SNS Türevlerinin Sentezi

3.7.1. 1,4-di-tiyofen-2-il-bütan-1,4-dion sentezi

Stokiyometrik olarak alüminyum klorür, diklorometan içerisinde 15 °C’de karıştırılmıştır. Tiyofen, süksinil klorür ve diklorometan içeren karışım reaksiyon ortamına kademe kademe eklenmiştir. Reaksiyon boyunca sıcaklık 15 °C’ de sabit tutulmuştur. Tepkime, hidroklorik asit içeren buzlu suya yavaş yavaş eklenerek sonlandırılmıştır. Bu karışım doygun NaHCO₃ çözeltisi ve doygun NaCl çözeltisi ile yıkanmış ve MgSO₄ ile kurutulmuştur. Ham ürün kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır.



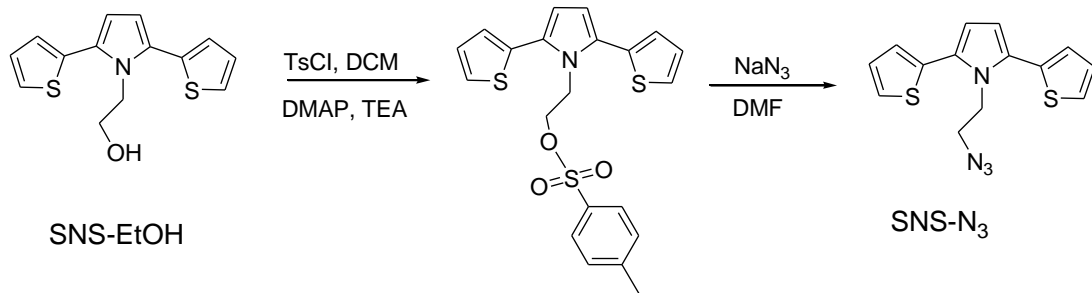
Şekil 3.2. SNS tabanlı monomerlerin sentezi

3.7.2. Paal-Knorr tepkimesi ile SNS türevlerinin sentezi

Monomerler 1,4-di-tiyofen-2-il-bütan-1,4-dion ile 2-etil-hegzilamin, etanolamin ve p-diaminbenzen yapıları ile ayrı ayrı uygun koşullarda Paal-Knorr tipi bir tepkime ile sentezlenmiştir. Sentezler sonucunda sırasıyla Şekil 3.2’de belirtilen 1-(2-etil-hegzil)-2,5-di-tiyofen-2-il-1H-pirol (SNS-HE) (Çamurlu 2012), 2-(2,5-di-tiyofen-2-il-pirol-1-il)-etanol (SNS-Et) ve 2-(2,5-di-tiyofen-2-il-pirol-1-il)-benzenamin (SNS-An) (Yıldız 2008) sentezlenmiştir.

3.7.3. 1-(2-azido-etil)-2,5-di-tiyofen-2-il-H-pirol sentezi (SNS-N₃) sentezi

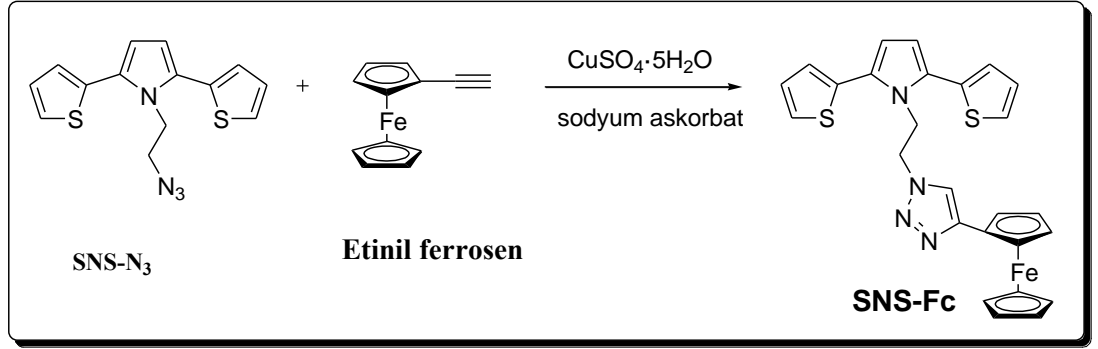
Uygun stokiyometride toluen-4-sülfonik asit 2-(2,5-di-tiyofen-2-il-pirol-1-il)-etil ester dimetilformamid’ de çözülmüştür. Reaksiyon ortamına 5 mmol sodyum azid parça parça eklenmiş ve sıcaklık 50 °C’ye getirilmiştir. Reaksiyon sonlandırılmış ve diklorometan / su ile ekstrakte edilmiştir. Doymun NaHCO₃ ve doymun NaCl çözeltisi ile yıkanmış ve MgSO₄ ile kurutulmuştur. Kolon kromatogrası ile saflaştırılmıştır (Topçu 2011).



Şekil 3.3. 1-(2-azido-etil)-2,5-di-tiyofen-2-il-H-pirol sentezi

3.7.4. SNS-Fc sentezi

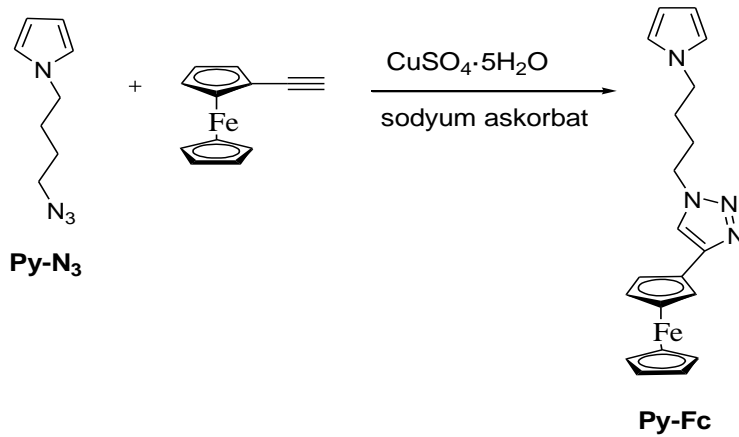
Şekil 3.4'deki yöntem ile sentezlenen SNS-N₃ ve etinil ferrosen tetrahidrofuran içerisinde çözülmüş ve daha sonra sırası ile su, 1 M CuSO₄·5H₂O ve 1 M sodyum askorbat ilave edilmiştir. 3 saat reaksiyondan sonra çözücü uzaklaştırılmış ve tepkime karışımı diklorometan ile ekstrakte edilmiştir. Kolon kromatografisi ile saflaştırılan SNS-Fc maddesinin yapısı spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiştir (Bicil 2013).



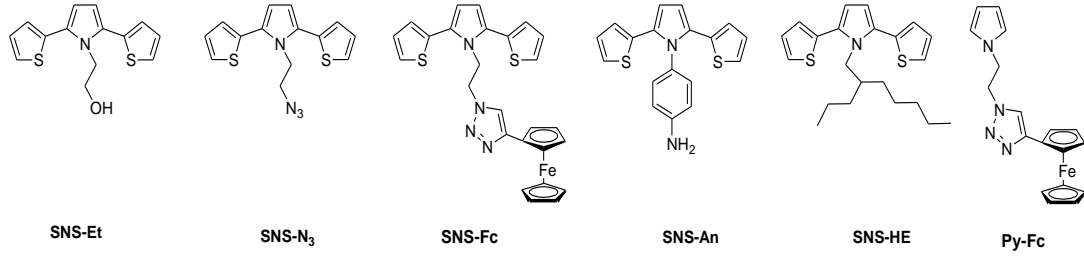
Şekil 3.4. SNS-Fc sentezi

3.7.5. 4-ferrosenil-1-(4-pirol-1-il-bütül)-1H-[1,2,3]triazol (Py-Fc) sentezi

Tetrahidrofuran (THF) içerisinde uygun stokiyometride Py-N₃ ve etinil ferrosen oda sıcaklığında ve azot atmosferinde 5 dakika karıştırılmıştır. Reaksiyon ortamına 5 mL saf su eklenip karıştırılmış ve sonra 1 M CuSO₄·5H₂O çözeltisinden 0,1 mL ilave edilmiştir. 1 M'lık sodyum askorbat çözeltisinden 0,17 mL eklenmiş ve reaksiyon oda sıcaklığında 3 saat karıştırılmıştır. Çözgen uzaklaştırılmış ve tepkime karışımı diklorometan ile ekstrakte edilmiştir. Madde Kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Py-Fc Şekil 3.5'de gösterildiği gibi sentezlenmiştir (Çamurlu 2016). Şekil 3.6' da tez kapsamında sentezlenen tüm monomerlerin yapıları gösterilmiştir.



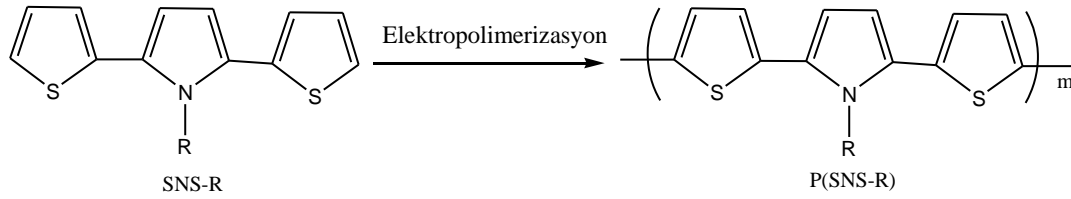
Şekil 3.5. 4-ferrosenil-1-(4-pirol-1-il-bütül)-1H-[1,2,3]triazol (Py-Fc) sentezi



Şekil 3.6. Tez kapsamında sentezlenen ve kullanılan monomerler

3.8. İletken Polimerin Sentezi

İletken polimerlerin sentezinde 0,1 M 1,5 mL LiClO₄/ACN ortamında SNS veya pirol türevi monomerlerin elektrokimyasal polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen iletken polimerler tarama hızı çalışması ve biyosensör çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrıca SNS-An ve SNS-Fc monomerleri ile 3,4-etilendioksitiyofen varlığında elektrokimyasal kopolimerizasyon gerçekleştirilmiş ve ilgili kopolimerler biyosensör uygulamasına uygunluğu çalışılmıştır.



Şekil 3.7. Elektrokimyasal polimerizasyon

3.9. P(SNS-An) Sentezi

Karşıt elektrot olarak Pt telin, referans elektrot olarak gümüş telin ve çalışma elektrodu olarak platin levha kullanıldığı hücre içerisine 0,1 M LiClO₄ ve 0,1 M NaClO₄ asetonitrilde hazırlanmıştır. Elektrokimyasal polimerizasyon ortama 5,0 mg/mL SNS-An monomer varlığında (-0,5 – 1,2 V) arasında 100 mV/s tarama hızı ile potansiyometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Polimer kaplı elektrot yüzeyinde bulunan monomer ve oligomerlerin uzaklaştırılması için 10 dk boyunca saf asetonitrilde bekletilmiştir.

3.10. P(SNS-Fc), P(SNS-Et), P(SNS-HE) Homopolimerlerinin Sentezi

Temizlenmiş ve hazırlanmış elektrot sistemi ile cam hücre içerisine destek elektrolit olarak 0,1 M 1,5 mL LiClO₄/ACN çözeltisinin üzerine 1,5 mg/mL SNS-R/ACN, monomeri ile eklendikten sonra homopolimer potansiyodinamik olarak (0,0 - 0,9) V aralığında dönüşümlü voltamogram ile sentezlenmiştir. Polimer kaplı elektrot saf asetonitrilde yıkanmıştır.

3.11. P(SNS-N₃) Sentezi

Temiz platin levha elektrot yüzeyine üçlü elektrot sisteminde ACN içerisinde LiClO₄ ve TBAPF₆ elektrolitleri varlığında 0,01 M SNS-N₃ monomeri eklenmiştir. Elektrot yüzeyinde polimerleştirme potansiyodinamik olarak (0,0-1,0) V aralığında dönüşümlü voltamogram ile yapılmıştır (Çamurlu 2013). Daha sonra yapılan çalışmalarda polimerin biyosensör için yeterince kaplanmadığı kanısına varılmış ve biyosensör çalışması yapılamamıştır.

3.12. P(Py-Fc) Sentezi

Temiz olarak hazırlanmış platin levha elektrot yüzeyine üçlü elektrot sisteminde ACN içerisinde TBAPF₆ elektrolit varlığında 0,01 M Py-Fc monomeri eklenmiştir. Elektrot yüzeyinde polimerleştirme potansiyodinamik olarak (-0,6 - 1,0) V aralığında dönüşümlü voltamogram ile yapılmıştır (Çamurlu 2013). Daha sonra yapılan çalışmalarda polimerin biyosensör için yeterince kaplanmadığı kanısına varılmış ve biyosensör çalışması yapılamamıştır.

3.13. P(SNS-An –ko- EDOT) Kopolimerinin Sentezi

Daha önce mekanik ve elektrokimyasal olarak temizlenen platin levha çalışma elektrodu, Ag/AgCl elektrot referans elektrot ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Cam hücre içerisine destek elektrolit olarak 0,1 M LiClO₄ ve 0,1 M NaClO₄ koyulmuş ve 5,0 mg/mL SNS-An/ACN, 3,0 µL EDOT monomerleri eklendikten sonra kopolimer potansiyodinamik olarak sentezlenmiştir. Polimer kaplı elektrot yüzeyinde bulunan monomer ve oligomerlerin uzaklaştırılması için 10 dk boyunca saf asetonitrilde bekletilmiştir.

3.14. P(SNS-Fc-ko-EDOT) Kopolimerinin Sentezi

Temizlenmiş ve hazırlanmış elektrot sistemi ile cam hücre içerisine 1,5 mL 0,1 M LiClO₄/ACN ile 1,5 mg/mL SNS-Fc/ACN, 3,0 µL EDOT monomerleri eklendikten sonra kopolimer potansiyodinamik olarak (0,0-0,9) V aralığında dönüşümlü voltamogram ile sentezlenmiştir. Polimer kaplı elektrot saf asetonitrilde yıkanmıştır.

3.15. Biyosensörlerin Hazırlanması

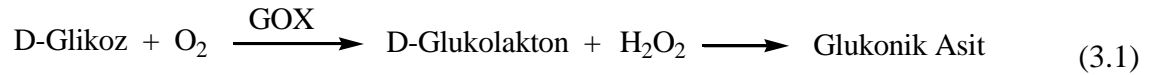
İletken polimer (CP) kaplanmış elektrotun üzerine 1 mg MWCNT/ 1 mL etanol karışımından 10 µL damlatılmış ve oda şartlarında kurutulmuştur. Daha önce tampon içerisinde hazırlanmış enzim çözeltilerinden optimum olarak belirlenen miktarı kadar iletken polimer kaplı elektrot yüzeyine damlatılmış ve yaklaşık 1 saat oda şartlarında kuruması beklenmiştir. En son aşamada ise % 1' lik gluteraldehit çözeltisinden optimum olarak belirlenmiş miktar damlatılmış ve oda koşullarında kuruması beklenmiştir. Hazırlanan enzim elektrotları 0,1 M fosfat tamponu ile yıkanarak kullanıma hazır hale

getirilmiştir. Enzim elektrotları kullanılmadığında 0,1 M, pH=7,0 fosfat tamponu içerisinde +4°C’de saklanmıştır.

3.16. Ölçüm Tekniği

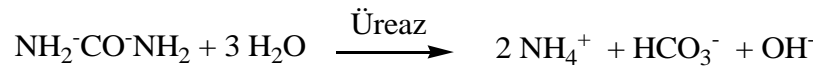
Hazırlanan enzim elektrotlarının substrata olan cevapları kronoamperometri yöntemi ile incelenmiştir. Optimum pH ortamında 3 elektrotlu çalışma hücresine 10 mL 0,1 M fosfat tamponuna koyulup, 1,2 mg/ mL olacak şekilde sodyum dodesil sülfat (SDS) koyulmuştur. Ölçümler enzim elektrotu için belirlenen optimum potansiyelin sabit olarak uygulanmasıyla ve 200 rpm karıştırma hızıyla gerçekleştirilmiştir. Substrat eklenmeden önce elektrodun akım cevabının sabitlenmesi beklenmiştir. Daha sonra eklenen substrat miktarına karşı akımdaki değişiklikler kaydedilmiştir.

Glikoz tayini için hazırlanan elektrot yüzeyinde glikoz ile glikoz oksidaz enzimi arasındaki reaksiyon 3.1’de verilmiştir. 3.2’de ise enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenmesi verilmiştir. Amperometrik yöntemlerde genellikle oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenmesiyle elde edilen akımların glikoz derişimine bağlılığından tayin edilmiştir. Bir diğer yöntemde ise enzimatik reaksiyon sonucu tüketilen oksijenin indirgenmesiyle elde edilen akımların glikoz derişimine bağlılığından tayin edilmiştir.

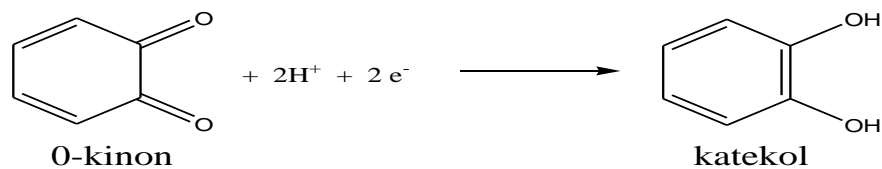


Tez çalışmasında glikoz sensörlerinin hem H₂O₂ yükseltgenme hem de O₂ indirgenme potansiyellerinde çalışmalar yapılmıştır.

Üre biyosensörlerinde üre üreaz enzimi ile hidroliz olmaktadır. Bu hidroliz sonucunda oluşan amonyum iyonunun takibi ile analiz yapılmaktadır (Dhawan 2009).



Fenollerin tayini kinon ürünlerinin salınmasının izlenmesi ya da oksijen tüketiminin izlenmesine dayanmaktadır (Zeyrek 2010). Bu çalışmada katekolün enzim ile etkileşmesinden oluşan o- kinonun elektrokimyasal etki ile yeniden katekole dönüşümü takip edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Polifenollerin ölçüm mekanizması

3.17. Çalışma Parametrelerin Belirlenmesi

3.17.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi

Çalışma potansiyelinin belirlenmesi için kronoamperometrik yöntem kullanılmıştır. Burada çalışma elektrodu olarak enzim elektrodu, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrodu ve karşı elektrot olarak platin tel kullanılan üçlü elektrot sisteminde, pH'ı 7,0 olan 10 mL 0,1 M fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Her bir potansiyel için ayrı ayrı ölçümler alınmıştır. Örneğin 0,7 V sabit potansiyel için çalışma elektrodu üçlü elektrot sisteminde 0,7 V sabit potansiyelde dengeye geldikten sonra hücre içi derişimi 1 M olacak şekilde substrat çözeltisi eklenmiş ve denge akımı kaydedilmiştir. Bu işlemler belirlenen diğer potansiyeller için de tekrarlanmıştır.

Hazırlanan elektrodun aktivitesine pH etkisini incelemek için pH'ı 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 ve 7,5 olan fosfat tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Örneğin pH=7,0 fosfat tampon çözelti için üçlü elektrot sisteminde optimum potansiyelde kararlı hale geldikten sonra hücre içi 1 mM sabit substrat derişiminde 50 saniye sonundaki denge akımı kaydedilmiştir. Bu işlemler belirlenen diğer tamponlar için de tekrarlanmıştır. Kaydedilen akım değişimleri pH'a karşı grafiğe geçirilmiş ve optimum pH değeri belirlenmiştir.

3.17.2. Enzim miktarı ve glutraldehit miktarı etkisi

Biyosensör için optimum enzim miktarını bulmak için farklı miktarlarda enzim immobilize edilmiştir. Glikoz oksidaz enzimi ile yapılan çalışmalarda iletken polimer kaplı elektrot yüzeyine 25-150 ünite arasında enzim yüklenmiştir. Üreaz enzimi ile yapılan çalışmalarda 10-100 ünite ve tirozinaz enzimi ile 20-100 ünite arasında optimum çalışması yapılmıştır. Enzim yüklenmiş elektrotlar glutraldehit ile çapraz bağlanmış ve daha sonra buzdolabında +4°C'de pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde muhafaza edilmiştir. Bu hazırlanan elektrotlar optimum potansiyelde dengeye getirildikten sonra ortamda 0,5 veya 1 mM substrat olacak şekilde kronoamperometrik ölçümler alınmıştır. Ölçülen akım değişimleri enzim miktarına karşı grafiğe geçirilmiş ve optimum enzim miktarı (ünite) belirlenmiştir.

Daha önce pH=7,0 fosfat tamponu içerisinde % 1'lik glutraldehit çözeltisi hazırlanmıştır. İletken polimer kaplı platin elektrotların her bir yüzeyine önce CNT daha sonra enzim yüklenmiş kuruması için oda koşullarında ve desikatör içerisinde 1 saat beklenmiştir. Pt/CP/CNT/GOX elektrotlarının her bir yüzeyine hazırlanan glutraldehit çözeltisinden 7,5, 10, 12,5 ve 15 µL miktarı damlatılmış ve desikatörde kuruması için yaklaşık 2,5 saat beklenmiştir. Hazırlanan elektrotlar pH=7,0 fosfat tamponunda +4°C'de kullanılmadığında saklanmıştır. Farklı miktarlarda glutraldehit yüklenmiş enzim elektrotları optimum tamponda ve sabit potansiyel altında dengeye gelmesinden sonra Hücre içerisinde substrat derişimi 0,5 veya 1 mM olacak şekilde her bir elektrodun verdiği cevaplar kaydedilmiş. Glutraldehit miktarına karşı substrat varlığındaki kronoamperometrik cevapları grafiğe geçirilerek optimum miktar belirlenmiştir.

3.17.3. Karbon nanotüp (CNT) etkisi

Daha önce etanol içerisinde 1 mg CNT/ mL olarak hazırlanan karışım ultrasonik banyoda 1 saat dispers edilmiştir. İletken polimer kaplı platin elektrotların her bir yüzeyine 5, 10 ve 15 µL CNT çözeltisinden damlatılmış ve kuruması için oda koşullarında ve desikatör içerisinde 1 saat beklenmiştir. Üzerine önce optimum miktarlarda enzim ve glutraldehit yüklenerek enzim elektrodu hazır hale getirilmiştir. Farklı miktarlarda CNT yüklenmiş enzim elektrotları optimum tamponda ve sabit potansiyel altında dengeye gelmesinden sonra hücre içerisinde substrat derişimi 0,5 veya 1 mM olacak şekilde her bir elektrodun verdiği cevaplar kaydedilmiş ve birbirleriyle karşılaştırılarak optimum miktar belirlenmiştir.

3.17.4. Fulleren (C₆₀) etkisi

P(SNS-An –ko- EDOT) kopolimeri ile yapılan glikoz biyosensöründe karbon nanotüp yerine sinyal artırıcı olarak fulleren kullanılmıştır. Bunun için önce etanol içerisinde 1 mg C₆₀ / mL olarak hazırlanan çözelti ultrasonikasyon banyoda 1 saat sonunda dispers edilmiştir. İletken polimer kaplı platin elektrotların her bir yüzeyine 10 µL C₆₀ çözeltisinden damlatılmış ve kuruması için oda koşullarında ve desikatör içerisinde 1 saat beklenmiştir. Üzerine optimum miktarlarda enzim ve glutraldehit yüklenerek enzim elektrodu hazır hale getirilmiştir. Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/C₆₀/GOX biyosensörünün analitik performansları incelenmiştir. Biyosensörün analitik performansları sonucunda karbon nanotüple yapılan biyosensörün performansı ile karşılaştırılmıştır. Değerlendirme sonucunda bu çalışma için karbon nanotüpün daha uygun olduğu düşünülmüş ve sonraki çalışmalarda sinyal artırıcı olarak CNT kullanılmasına karar verilmiştir.

3.18. Biyosensörlerin Analitik Performanslarının Değerlendirilmesi

3.18.1. Substrat derişiminin etkisi

Substrat derişiminin hazırlanan biyosensörün amperometrik cevabına etkisini incelemek için optimum koşullarda dengeye getirilen çalışma hücresine uygun miktarda substrat eklenmiş ve 50 saniye sonundaki kronoamperometrik cevapları kaydedilmiştir. Amperometrik ölçüm sonunda elde edilen akım değişimleri substrat derişimlerine karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.18.2. Gözlenebilme sınırı (LOD)

Gözlenebilme sınırı (limit of dedection (LOD) bir biyosensörle belli bir güven seviyesinde rapor edilebilir en küçük derişim değeri olarak adlandırılır. LOD değerini tespit etmek için hazırlanan biyosensörün sinyal/görültü oranının 3 olduğu ve substrat derişiminin düşük olduğu çalışma ile akım değişimleri belirlenmiştir. Düşük derişimde S/N=3 olduğu sistemde 10 ölçümdeki akım değişimleri kaydedilmiş ve bu akım değişimlerinin standart sapması (s) hesaplanmıştır. Hazırlanan biyosensörün LOD değeri için bulunan standart sapma “3 s/m” formülünde yerine konularak hesaplanmıştır.

3.18.3. Enzim elektrotların kullanım kararlılığı

Üçlü elektrot sisteminde hazırlanan hücre içinde optimum şartlarda dengeye getirilen biyosensörün tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için 1 mM substrat derişiminde elde edilen amperometrik cevaplar kaydedilmiştir. Ölçümler aynı gün içinde ve arka arkaya yapılmıştır. Ölçümler sonucu elde edilen akımdaki bağıl değişimlerine karşı ölçüm sayısı grafiğe geçirilmiş ve aktivitedeki bağıl azalma aşığıdaki eşitlikten hesaplanmıştır. ΔI_0 ilk ölçümde kaydedilen akım değişimi ve ΔI_n ölçüm sonunda kaydedilen akım değişimi olarak ifade edilir.

$$\% \text{ bağıl aktivite} = \frac{\Delta I_n}{\Delta I_0} * 100 \quad (3.11)$$

3.18.4. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Üçlü elektrot sisteminde hazırlanan hücre içinde optimum şartlarda dengeye getirilen biyosensörün raf ömrünü belirlemek için kalibrasyon grafiğinde doğunluğa yakın bir derişimde substratın eklenmesiyle elde edilen amperometrik cevaplar kaydedilmiştir. Amperometrik ölçümler belirli periyotlarla tekrar edilmiştir. Ölçümler sonucu elde edilen akım değişimlerine karşı zaman grafiğe geçirilmiş ve aktivitedeki bağıl azalma belirlenmiştir. Hazırlanan biyosensör kullanılmadığında pH=7,0 fosfat tamponu içerisinde +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.18.5. Girişim etkisinin incelenmesi

Daha önce hazırlanmış ve dengeye getirilmiş biyosensörün optimum şartlarda 0,5 mM substrat derişimi ile elde edilen amperometrik cevap akımının dengeye gelmesi ile gerçek numune analizinde girişim etkisi yapabilecek maddeler ortama eşmolar eklenerek girişim etkileri incelenmiştir. Girişim etkisi için askorbik asit, fruktoz, sakkaroz, sitrik asit, ürik asit, vb. maddeler kullanılmıştır.

3.18.6. Gerçek numune analizi

Hazırlanan biyosensörün ticari olarak uygulanabilirliğini incelemek amacıyla glikoz biyosensörü için bazı meyve sularındaki glikoz miktarları belirlenmiş ve bulunan sonuçlar spektroskopik tayin yöntemiyle elde edilen sonuçlarla kıyaslama yapılmıştır. Üre biyosensörü için gerçek numune olarak hastanede üre tayini yapılmış idrar numunesi alınmış ve bulunan cevaplar Siemens Advia 2400 model spektroskopik cihaz ile elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

Tez kapsamında öncelikli olarak çalışma elektrot türünün belirlenmesi için literatürdeki çalışmalar esas alınarak değerlendirmeler yapılmıştır. Bu noktada polimer olarak PPy tercih edilmiş ve GOX içeren ve içermeyen elektrotlar hazırlanmış ve H₂O₂ takibi için kullanılmıştır. Platin disk ve GCE elektrotları ile çıplak ve iletken polimer kaplı halde çalışmalar yapılmıştır. Bu elektrotlar ile yapılan amperometrik çalışmalar sonucunda çalışma aralığının dar olması, tekrarlanabilirliğinin az olması ve sinyallerin düzgün olmamasından dolayı tez kapsamında çalışma elektrodu olarak 0,5 x 0,5 cm kesitinde platin levha elektrotu kullanılmasına karar verilmiştir.

Platin levha üzerine SNS türevli (SNS-An, SNS-HE, SNS-Et, SNS-N₃ ve SNS-Fc) ve Py-Fc monomerleri elektrokimyasal olarak polimerleşmesiyle matris olarak kaplanmıştır. İletken polimer kaplı elektrotlar üzerine sinyal artırıcı olarak CNT yüklendikten sonra glutraldehit çapraz bağlayıcı ile enzim (GOX, PPO ve üreaz) immobilize edilmiştir. P(SNS-An -ko- EDOT) kopolimer ile yapılan çalışmada CNT yerine fulleren (C₆₀) yüklemiş ve karbon nanometaryel etkisi incelenmiştir. CNT'ün sinyal artırıcı etkisi fullerene göre daha fazla olduğundan sonraki çalışmalarda CNT tercih edilmiştir. Sonraki çalışmalarda monomer yapısının etkisini incelemek üzere farklı PSNS'ler ile glikoz biyosensörleri hazırlanmıştır. Biyosensörlerin değerlendirmesi genelde ya enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H₂O₂ ürününün yükseltgenmesinin izlenmesi ya da bu enzimatik reaksiyonda tüketilen O₂ nin indirgenmesi reaksiyonunun takip edilmesiyle yapılmaktadır. Hazırlanan biyosensörlerin çalışma potansiyeli, pH, enzim miktarı, glutraldehit miktarı ve CNT miktarı gibi parametreler optimize edilmiştir. Biyosensörlerin optimizasyon çalışmalarından sonra analitik performansları incelenmiştir.

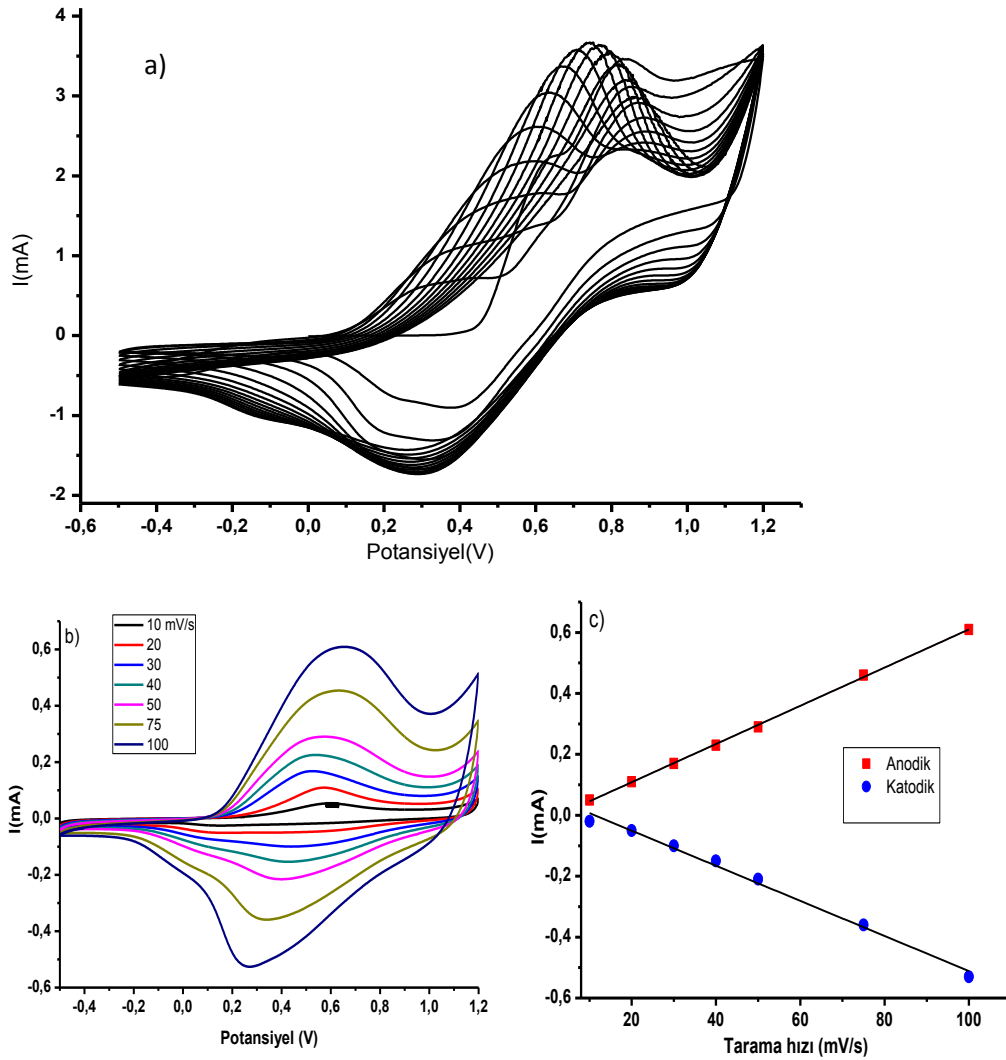
Karbon nanotüpler (CNT)'in çelikten çok daha güçlü olmaları, iyi termal ve elektriksel iletkenlik taşımaları, bu nanometaryellerin avantajları olarak sayılmaktadır. CNT'ler tek duvarlı (SWCNT), iki duvarlı (DWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) yapıları bulunmaktadır. Karbon nanotüpler çok iyi elektriksel iletkenlikleri ve geniş yüzey alanına sahip olmalarından dolayı elektrokimyasal biyosensörlerde duyarlılık ve seçiciliği artırıcı olarak kullanılmaktadır (Merkoçi 2013). CNT kullanımı amperometrik enzim sensörlerinde enzimin redoks aktif merkezi ile elektrot arasında doğrudan elektron transferinin gerçekleşmesine yardımcı olabilmektedir (Banica 2012).

Glikoz oksidaz enzimi ile P(SNS-An), P(SNS-Fc), P(SNS-Et) ve P(SNS-HE) homopolimerinin yanısıra P(SNS-An -ko- EDOT) ve P(SNS-Fc -ko- EDOT) kopolimerleriyle de glikoz biyosensörleri hazırlanmıştır. Ayrıca, P(SNS-Fc) ve P(SNS-Fc -ko- EDOT) kullanılarak üre ve polifenol biyosensörü hazırlanmıştır.

4.1. P(SNS-An) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular

4.1.1. P(SNS-An) sentezi

Şekil 4.1’de SNS-An’nin $\text{LiClO}_4\text{-NaClO}_4/\text{ACN}$ içerisinde 100 mV/s tarama hızıyla kayıt edilen dönüşümlü voltamogramı verilmiştir. SNS-An monomerinin yükseltgenme potansiyelleri $0,64$ ve $0,84\text{ V}$ olarak belirlenmiş olup polimerin yükseltgenme ve indirgenme potansiyelleri sırasıyla $0,66$ ve $0,27\text{ V}$ bulunmuştur ve sonuçlar literatür ile uyumludur (Yıldız 2008). Grafikten görüleceği gibi her döngü de akım şiddetinin artması monomerin elektrot yüzeyinde polimerleştiğini göstermektedir. Optimum film kalınlığının belirlenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda potansiyometrik döngü sayısı $10, 15, 20$ ve 30 olarak değiştirilmiş ve 15 ’in üzerindeki döngü sayılarının kaplama kalitesine olumsuz yönde etki yaptığı belirlenmiştir. Bundan dolayı PSNS-An sentezinde $-0,5 - 1,2\text{ V}$ aralığında 15 döngünün optimum koşul olduğu kabul edilmiştir.

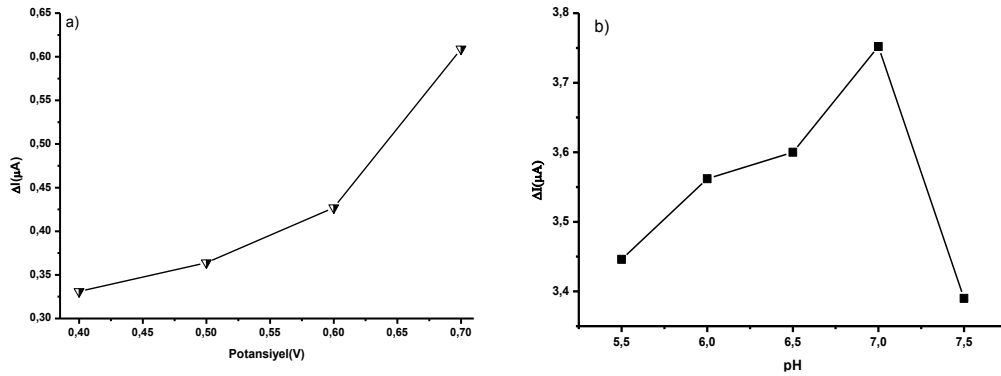


Şekil 4.1. $\text{ACN}/\text{LiClO}_4\text{-NaClO}_4$ ortamında, **a)** SNS-An’in 100 mV/s ’deki dönüşümlü voltamogramı; **b)** P(SNS-An)’in farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları; **c)** P(SNS-An)’in anodik ve katodik akımların tarama hızı ile değişimi grafiği

4.1.2. Biyosensörünün analitik performansının hidrojenperoksit ölçümüne bağlı olarak incelenmesi

4.1.2.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi

Tezin deneysel kısmında belirtildiği şekilde hazırlanan Pt/SNS-An/CNT/GOX elektrodu optimum potansiyel ve pH koşullarının belirlenmesi için çeşitli çalışmalara tabii tutulmuştur. Pt/SNS-An/CNT/GOX elektrodu için 0,4- 0,7 V arasında sabit glikoz derişiminde 4 farklı potansiyelde akım şiddetleri ölçülmüş ve potansiyele karşı akım şiddeti değişimi grafiğe geçirilmiştir (Şekil.4.2a). pH optimizasyonu için ise 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 ve 7,5 pH değerlerinde fosfat tamponları hazırlanmış ve sabit glikoz derişimi ile ölçümler yapılmıştır. P(SNS-An)/CNT/GOX için en yüksek akım değerinin ölçüldüğü 0,7 V ve pH 7,0 değerleri sonraki çalışmalarda uygun çalışma koşulu olarak belirlenmiştir.

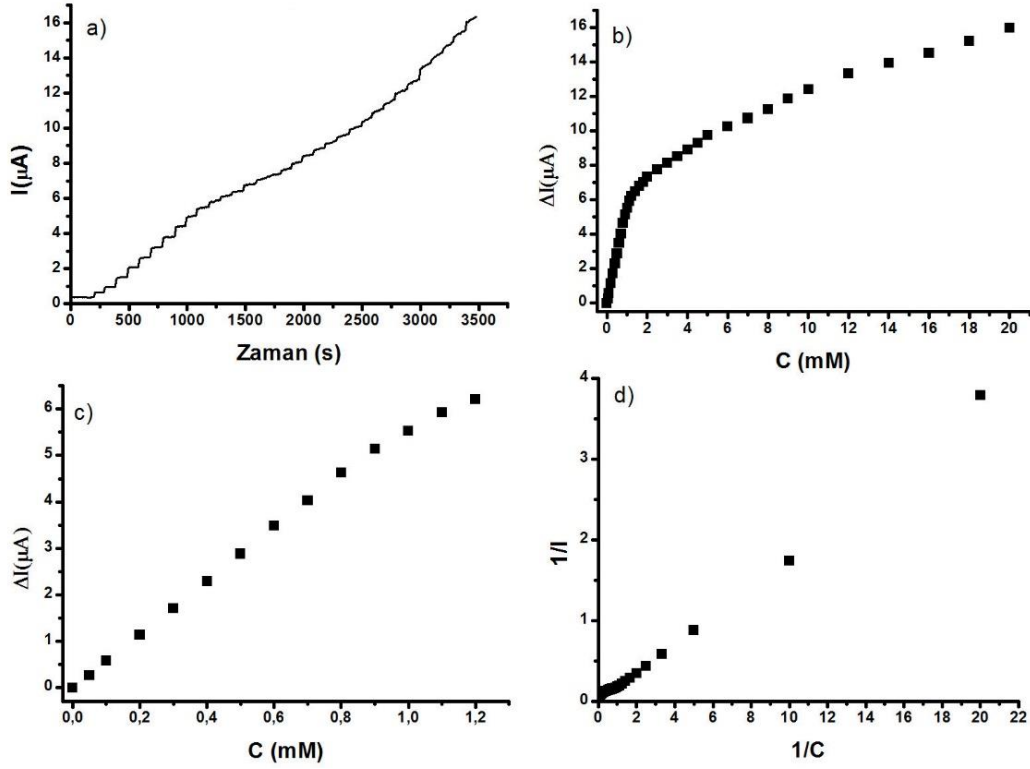


Şekil 4.2. Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörü için **a)** akım – potansiyel; **b)** akım – pH grafikleri (oda koşullarında, 1 mM glikoz, 0,1 M fosfat tamponu)

4.1.2.2. Kronoamperometrik bulgular

Hazırlanan Pt/PSNS-An/CNT/GOX biyosensörü için substrat derişiminin akım yoğunluğuna etkisi incelenmiş ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Şekil 4.3.a'da Pt/PSNS-An/CNT/GOX biyosensörünün 0,7 V sabit potansiyel için glikoz derişimi artıkça akım değerinin arttığı görülmektedir. Biyosensör kalibrasyon grafiğinin $y=5,331x + 0,122$ ($R^2=0,992$) eşitliğine uyduğu ve bu biyosensör için doğrusal aralığın 0,05 – 1,2 mM olduğu bulunmuştur. Ayrıca, biyosensör duyarlılığı $10,66 \mu A/(mM.cm^2)$ olarak ölçülmüştür.

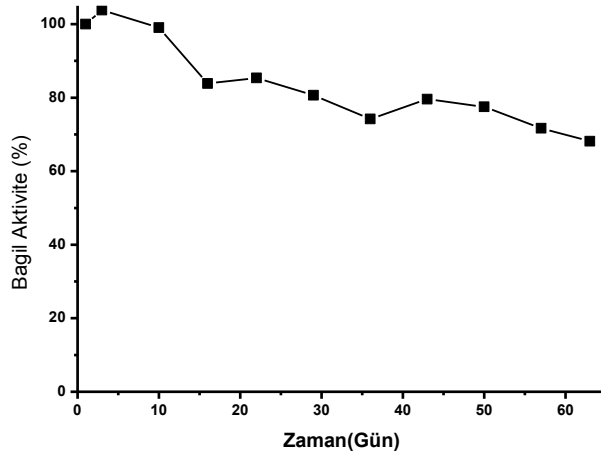
Çalışmanın bir sonraki aşamasında biyosensörün kinetik parametrelerini belirlenmesi için Lineweaver-Burk(LB) tipi eşitliğe göre $1/S$ 'ye karşılık $1/I$ grafiği çizilmiştir (Şekil 4.3d). Bilindiği gibi grafiğin eğimi K_m/I_{max} , kayım noktası ise $1/I_{max}$ değerini vermektedir. Buna göre Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörünün LB grafiğinden $Y=0,182x + 0,032$ ($R^2 0,996$) eşitliği için K_m ve I_{max} sırasıyla 5,56 mM ve 30,49 μA olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX için **a)** 0,7 V’da akım – zaman; **b)** glikoz derişimi ile akım şiddetindeki değişim; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,7 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşularında 25°C)

4.1.2.3. Raf ömrü

Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörlarının raf ömrü 0,7 V sabit potansiyelde toplam 9 hafta boyunca haftada bir takip edilmiştir. Şekil 4.4. incelendiğinde biyosensörün 44. gün %80 ve dokuzuncu hafta (63. gün) sonunda %68 oranında başlangıç aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4. Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, 0,70 V, 1 mM glikoz, oda sıcaklığı)

4.1.3. Biyosensörünün analitik performansının oksijen ölçümüne bağlı olarak incelenmesi

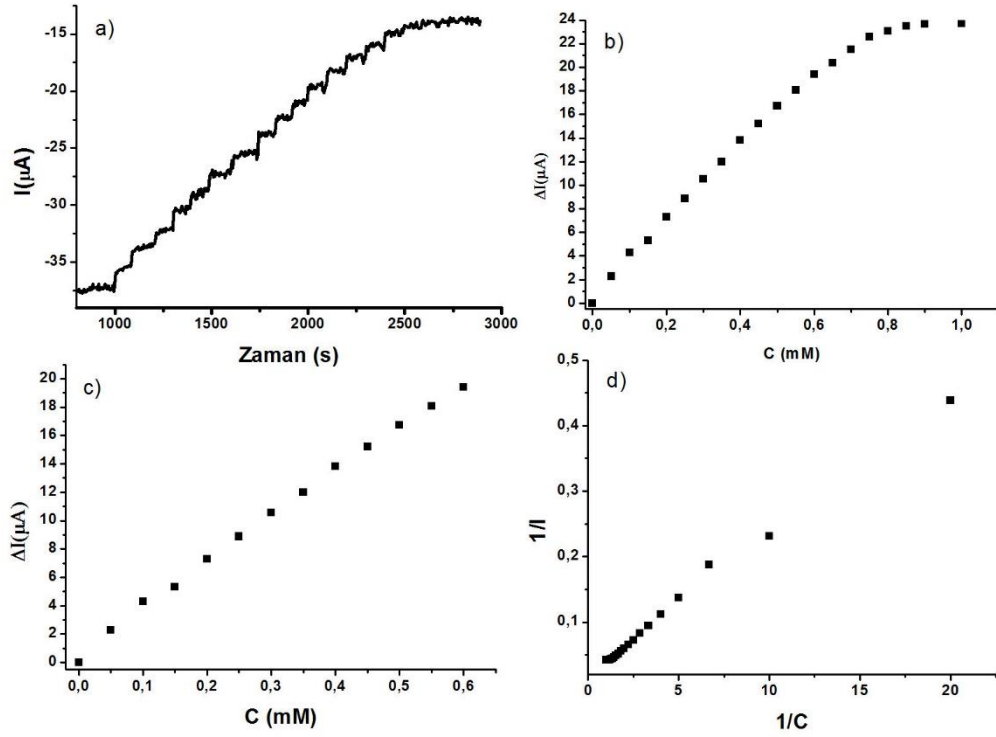
4.1.3.1. Kronoamperometrik bulgular

Bilindiği üzere, hazırlanan biyosensörün amperometrik cevabı H_2O_2 'in yükseltgenmesi üzerinden takip edilebileceği gibi, enzimatik tepkime sonucu oluşan O_2 'nin indirgenmesi üzerinden de takip edilebilir. Bu sebeple çalışmamızın bir sonraki aşamasında literatür verileri dikkate alınarak çalışma potansiyeli -0,7 V olarak kullanılmıştır.

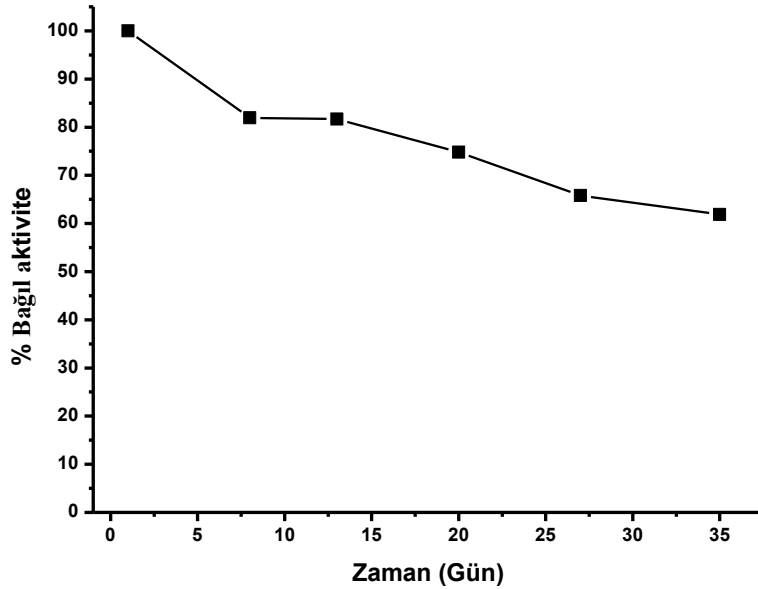
Şekil 4.5.'de görüldüğü üzere biyosensörün katalitik akımı artan glikoz derişimiyle artmaktadır. Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX glikoz biyosensörün kalibrasyon grafiğinin $y=31,96x + 0,71$ ($R^2=0,997$) eşitliğine göre doğrusal aralığı 0,05 – 0,7 mM ve duyarlılığı $63,92 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.5c). literatürde aynı iletken polimer ve enzim ile yapılan çalışmadan doğrusal aralık 0,1- 2,0 mM (Özdemir 2011) olarak dar ama duyarlılık olarak daha iyi değer elde edilmiştir. Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörü için LB grafiğinden $y= 0,0213x + 0,0203$ ($R^2=0,994$) eşitliği ile K_m ve I_{max} değerleri sırasıyla 1,05 mM ve 49,3 μA olarak bulunmuştur.

4.1.3.2. Raf ömrü

Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörlerinin raf ömrü tayini için elektrodun aktivitesi -0,7 V sabit potansiyelde 35 gün boyunca takip edilmiştir. Sensörün aktivitesinin %20'sini ilk bir hafta içerisinde kaybettiği, buna karşın ikinci haftasında %82'sini ve beşinci hafta (35. gün) sonunda başlangıç aktivitesinin %64'ünü koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX için **a)** $-0,7\text{ V}$ 'da akım – zaman; **b)** glikoz derişimi ile akım şiddetindeki değişim; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri ($-0,7\text{ V}$; $\text{pH}=7,0$; $0,1\text{ M}$ fosfat tamponu, oda koşularında 25°C)

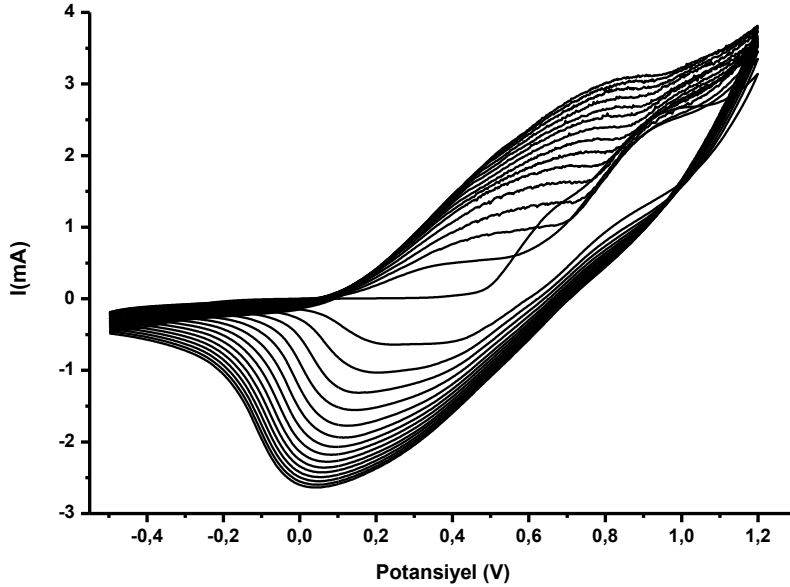


Şekil 4.6. P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği ($0,10\text{ M}$ $\text{pH}\ 7,0$ fosfat tamponu, $-0,70\text{ V}$, $0,5\text{ mM}$ glikoz, oda sıcaklığı)

4.2. P(SNS-An –ko- EDOT) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular

4.2.1. P(SNS-An –ko- EDOT) sentezi

Şekil 4.7’de SNS-An ve EDOT karışımının ACN/LiClO₄- NaClO₄ ortamında 100 mV/s tarama hızıyla dönüşümlü voltamogramları verilmiştir. Şekilden görüleceği gibi her döngü de akım değerlerinin artması monomerlerin elektrot yüzeyinde polimerleştiğini ve oluşan kopolimerin iletken olduğunu göstermektedir (Yıldız 2008).



Şekil 4.7. EDOT ve SNS-An’in ACN/LiClO₄- NaClO₄ ortamında, 100 mV/s’deki dönüşümlü voltamogramı

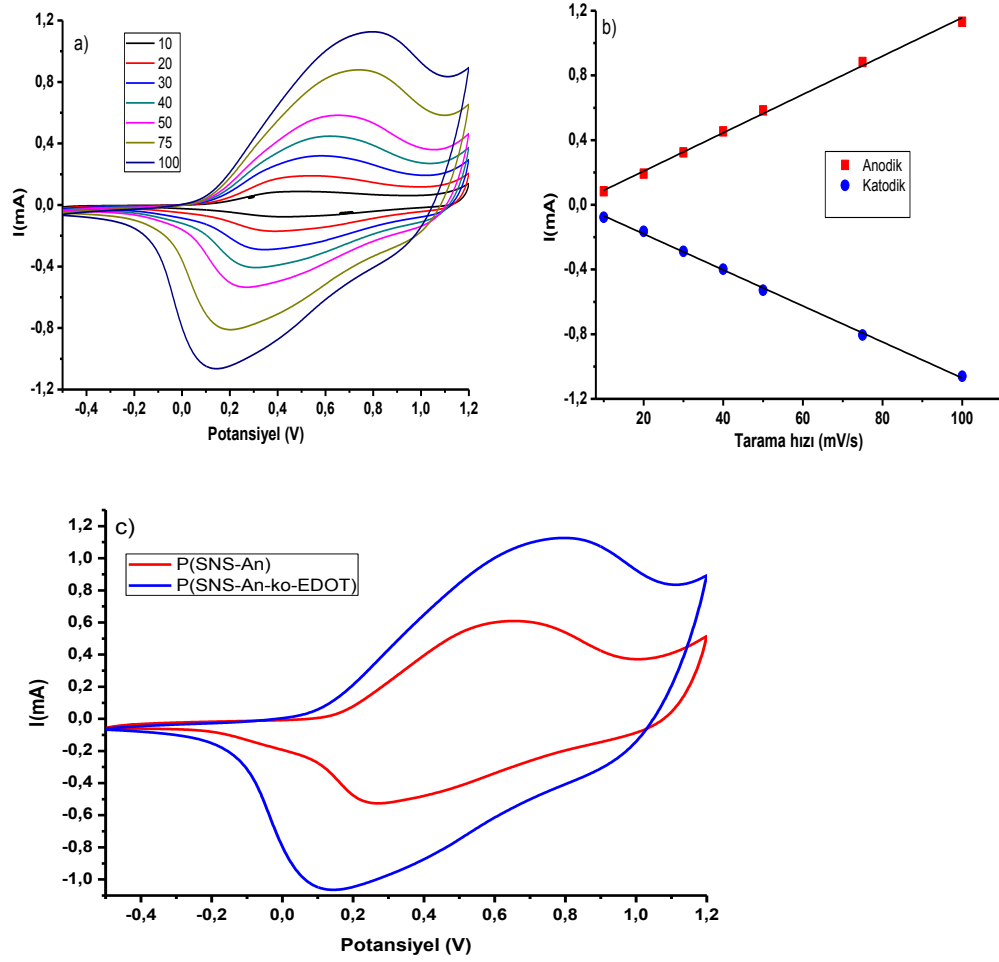
Şekil 4.8.’de aynı tarama hızında ve döngü sayısında kaplanan PSNS-An ve kopolimerin monomersiz ortamdaki voltamogramları verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi monomerin yükseltgenme piki 0,99 V olup kopolimerin indirgenme (0,05 V) ve yükseltgenme (0,85 V) potansiyelleri homopolimere göre daha düşüktür. Bu durum SNS birimlerinin arasına EDOT birimlerinin katılması ile oluşturulduğu düşünülmüştür.

4.2.2. P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörü ile ilgili bulgular

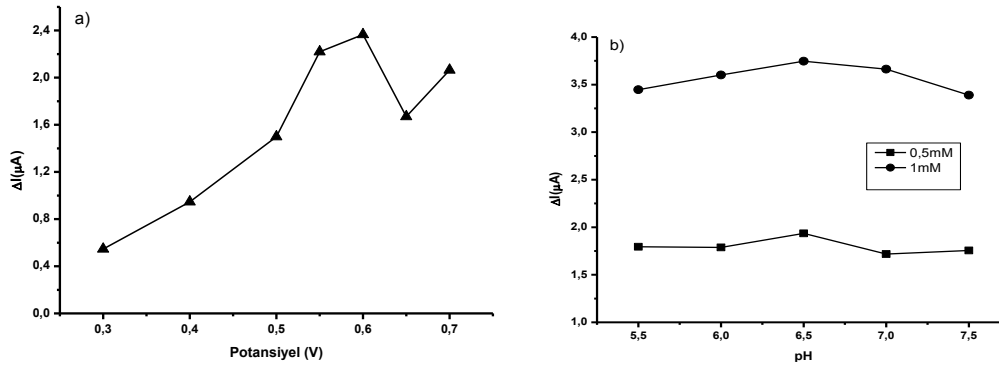
4.2.2.1. Biyosensörün analitik performansının hidrojenperoksit ölçümüne bağlı olarak incelenmesi

4.2.2.1a. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi

Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörü için uygun çalışma koşullarının belirlenmesi amacı ile 0,3- 0,7 V arasında sabit glikoz derişiminde 7 farklı potansiyelde akım artışları ölçülmüş ve potansiyele karşı akım şiddeti grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.9.’da görüldüğü gibi en yüksek akım değerinin ölçüldüğü 0,6 V optimum potansiyel olarak belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.



Şekil 4.8. Pt/P(SNS-An) ve Pt/P(SNS-An -ko -EDOT) elektrotların ACN/LiClO₄ ortamında, **a)** kopolimerin farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları; **b)** anodik ve katodik akımların tarama hızı ile değişimi; **c)** homopolimer ve kopolimerin 100 mV/s'daki dönüşümlü voltamogramları



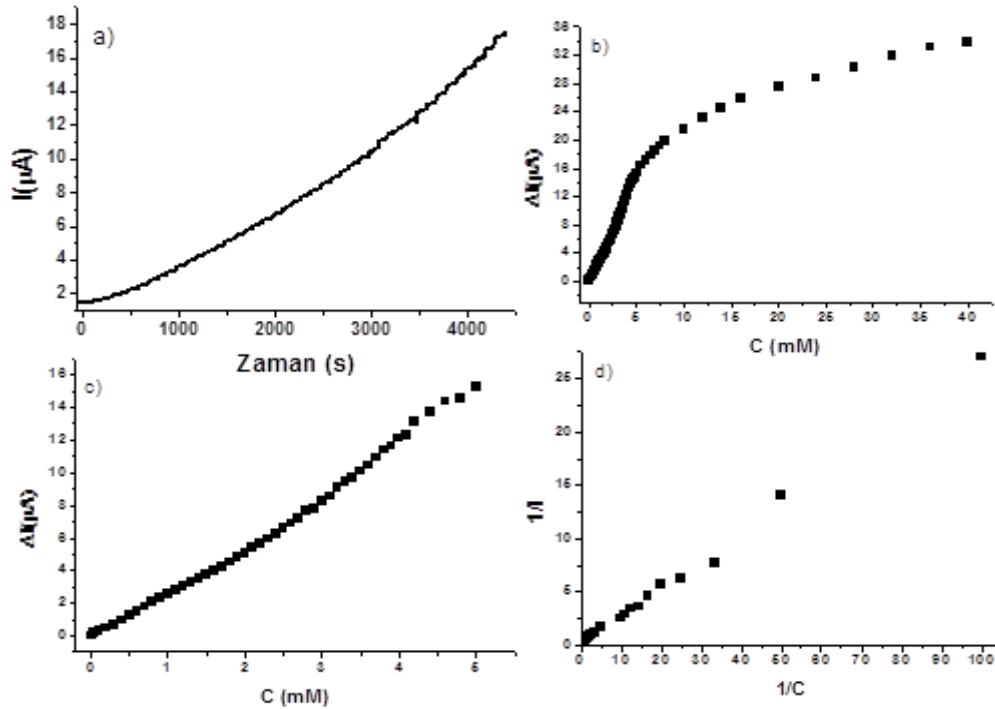
Şekil 4.9. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörü için **a)** akım – potansiyel; **b)** akım - pH grafikleri (oda koşullarında, 0,1 M fosfat tamponu, (■) 0,5 mM ve (●) 1mM glikoz)

Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün aktivitesine ortam pH'nın etkisini araştırmak amacıyla çeşitli pH'larda (5,5 – 7,5) 0,1M fosfat tamponları hazırlanmış ve 0,6 V da 0,5 mM ve 1 mM glikoz çözeltilerine karşı gösterdiği akım şiddeti ölçülerek ΔI 'e karşı pH grafiği hazırlanmıştır. Şekil 4.9b'de görüleceği gibi en yüksek akım artışı pH=6,5'de gözlenmiştir. Buna rağmen akım değerlerinin yakın olması, kullanım kolaylığı ve önceki bulgular ile kolay karşılaştırılabilmesi amacı ile optimum pH 7,0 olarak tercih edilmiştir.

4.2.2.1b. Kronoamperometrik bulgular

Çalışma elektrodu yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit 0,6 V sabit potansiyelde Ag/AgCl referans elektroduna karşı ölçülmüştür. Şekil 4.10a'da glikoz biyosensörün 0,6 V sabit potansiyelde her glikoz eklenmesinden sonraki akım değerlerinin zamana karşı grafiği incelenmiştir. Biyosensörünün katalitik akımı artan glikoz derişimiyle artığı gözlenmiştir.

Şekil 4.10b'de glikoz biyosensörü için 0,6 V sabit potansiyeldeki akım değişimine karşı glikoz derişimini gösteren kalibrasyon grafiği görülmektedir. Şekil 4.10b incelendiğinde 5,0 mM'dan daha yüksek miktarda glikoz eklenmesinin doğrusal davranıştan sapmaya neden olduğu görülmüştür. Amperometrik analiz sonucu biyosensörün $y = 3,4089x - 0,9817$ ($R^2=0,993$) eşitliğine göre 0,02 – 5,0 mM arasında doğrusal davranış gösterdiği ve gözlenebilme derişiminin ise 6,2 μM olduğu bulunmuştur. Biyosensörün duyarlılığı 6,86 $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.10. Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX 0,6 V'da **a)** akım – zaman; **b)** akım değişimi - glikoz derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,6 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün Michaelis-Menten grafiğinden Lineweaver Burk eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.10d) ve hazırlanan biyosensör LB eşitliği $y = 0,2682x + 0,0515$ ($R^2=0,997$) için K_m ve I_{max} değerleri sırasıyla 2,63 mM ve 10,53 μA olarak hesaplanmıştır.

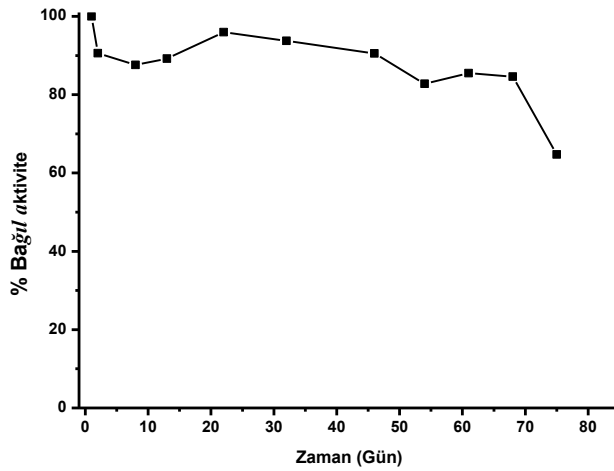
4.2.2.1c. Kullanım kararlılığı

Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirlik bakımından değerlendirilmesi 25 °C’de bir günde 25 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Alınan ölçümler sonucunda standart sapma $\pm 0,122$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 6,3 (n=25) olarak hesaplanmıştır. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX elektrodu yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup ardışık 25. kullanımda bile % 90 aktivite göstermektedir.

4.2.2.1d. Raf ömrü

Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi için optimum şartlar altında belirli günlerde yapılan deneylerden elde edilen amperometrik cevap akımları güne karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.11). Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörlerinin raf ömrü tayini için 0,6 V sabit potansiyel de aktiviteler birinci ve ikinci gün ard arda kontrol edildikten sonra haftada bir kontrol edilmiş ve 75 gün boyunca aktivitelerinin kontrolüne devam edilmiştir.

Şekil 4.11 incelendiğinde biyosensörün 40. gün sonunda aktivitede yalnızca %10’luk kayıp olduğu görülmektedir. 68. gün sonunda başlangıç aktivitesinin %84’ü oranında biyosensörün cevap verdiği ve 75. gün sonunda ise %64 cevap verdiği gözlemlenmiştir. Enzimin aktivitesinin azalması sıcaklığın, havanın ve bazı kimyasal maddelerin etkisi ile açıklanabilir. Biyosensörün aktivitesinde zamanla meydana gelen azalma beklenen bir sonuçtur. Biyosensörün raf ömrünün uzun olması kullanılan immobilizasyon yönteminin iyi olduğunu göstermektedir.

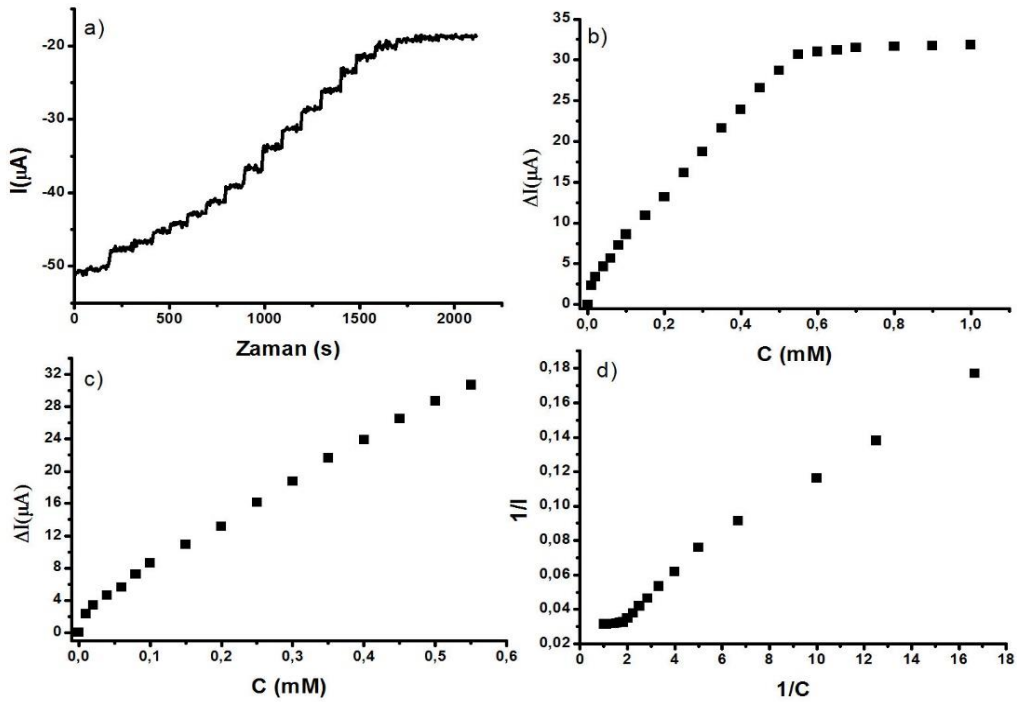


Şekil 4.11. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, 0,60 V, 1 mM glikoz, oda sıcaklığı)

4.2.2.2. Biyosensörün analitik performansının oksijene bağlı olarak incelenmesi

4.2.2.2a. Kronoamperometrik bulgular

Şekil 4.12b ve c'de glikoz biyosensörü için -0,7 V sabit potansiyeldeki akım değişimine karşı glikoz derişimini gösteren kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Amperometrik analiz sonucu biyosensörün doğrusal çalışma aralığı $y = 52,48x + 2,723$ ($R^2=0,9975$) eşitliği için 0,02 – 0,6 mM ve LOD değeri ise 1,9 μM olarak bulunmuştur. Duyarlılığı 104,96 $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ olarak bulunan Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensör LB eşitliği $y = 0,0096x + 0,0193$ ($R^2=0,992$) için K_m ve I_{max} değerleri sırasıyla 0,49 mM ve 51,81 μA olarak hesaplanmıştır(Şeli 4.12d).



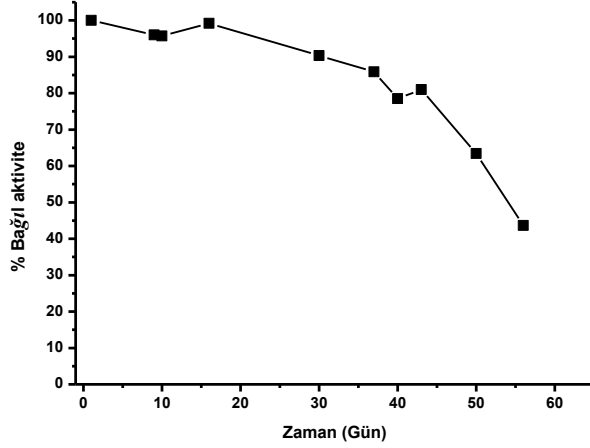
Şekil 4.12. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX -0,7 V'da **a)** akım – zaman; **b)** akım değışimi - glikoz derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (-0,7 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.2.2.2b. Kullanım kararlılığı

Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirliği 25 °C'de bir günde 20 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Alınan ölçümler sonucunda standart sapma $\pm 0,896$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 6,57 ($n=20$) olarak hesaplanmıştır. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX elektrodu 20. kullanımda bile % 82 aktivite göstermektedir.

4.2.2.2c. Raf ömrü

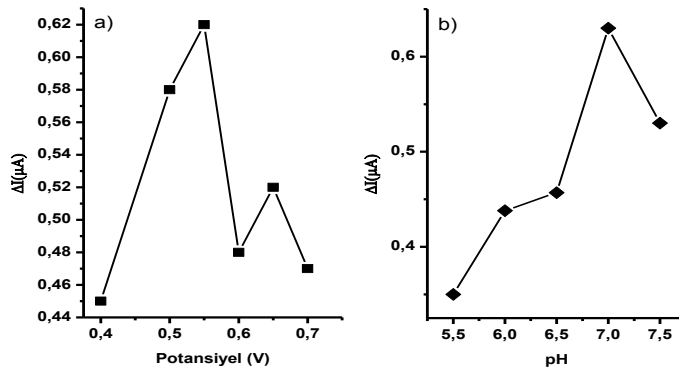
Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörlerinin raf ömrü tayini için -0,7 V sabit potansiyelde aktiviteler haftada bir kontrol edilmiş ve 57 gün boyunca aktivitelerinin kontrolüne devam edilmiştir. Şekil 4.13 incelendiğinde biyosensörün 44. gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 83 oranında biyosensörün cevap verdiğini ve sekizinci hafta (57. gün) sonunda ise % 44 aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, - 0,70 V, 0,5 mM glikoz, oda sıcaklığı)

4.2.3. P(SNS-An –ko- EDOT)/C₆₀/GOX biyosensörü ile ilgili bulgular

Yapılan çalışmada biyosensöre sinyal artırıcı nano materyal etkisi incelemek için karbon nanotüp yerine fulleren (C₆₀) kullanılmış ve Pt/P(SNS-An –co- EDOT)/ C₆₀/GOX biyosensör hazırlanmıştır. Bu elektrot için önce potansiyel ve pH çalışması yapılmış ve optimum çalışma potansiyeli 0,55 V ve pH 7,0 olarak görülmüştür. C₆₀ kullanımının çalışma potansiyelini nispeten azalttığı ve çalışma pH'ına ise etki etmediği görülmüştür.

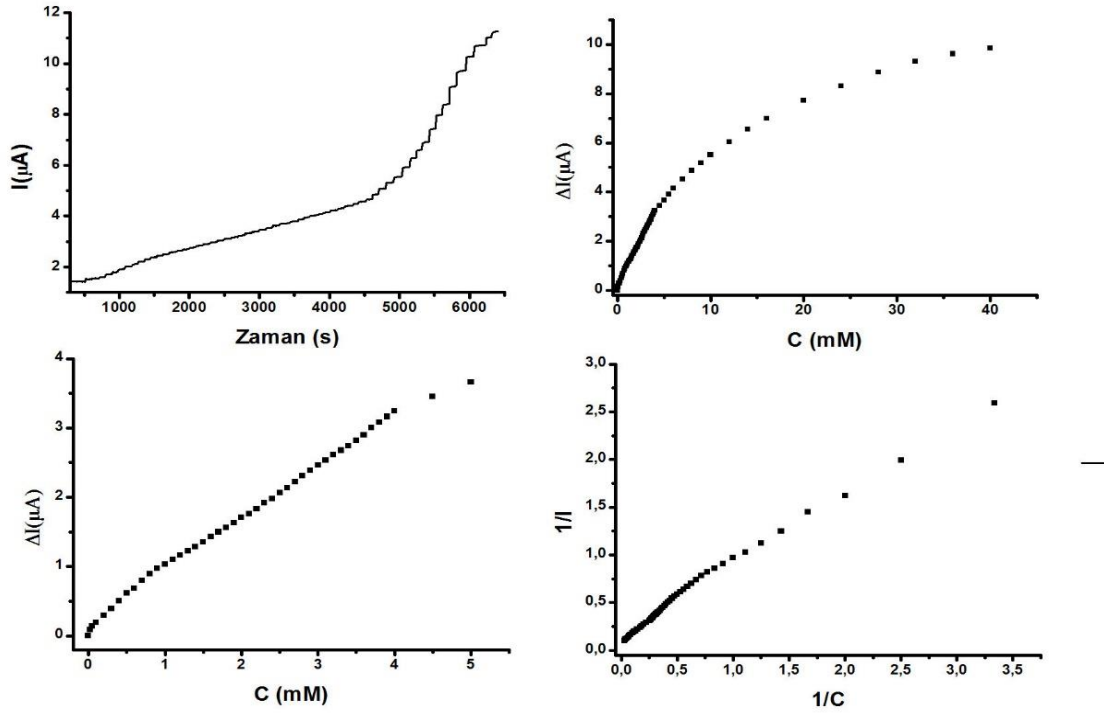


Şekil 4.14. Pt/P(SNS-An- co –EDOT)/C₆₀/GOX biyosensörü için a) akım – potansiyel; b) akım – pH grafikleri (oda koşullarında, 2 mM glikoz, 0,1 M fosfat tamponu)

4.2.3.1. Biyosensörün analitik performansının hidrojenperoksit ölçümüne bağlı olarak incelenmesi

4.2.3.1a. Kronoamperometrik bulgular

Çalışma elektrodu yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit 0,55 V sabit potansiyelde Ag/AgCl referans elektroduna karşı ölçülmüştür. Şekil 4.15'de glikoz biyosensörü için 0,55 V sabit potansiyeldeki akım değişimine karşı glikoz derişimini gösteren kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Şekil 4.15c incelendiğinde 5,0 mM'da daha yüksek miktarda glikoz eklenmesinin doğrusal davranıştan sapmaya neden olduğu görülmüştür. Amperometrik analiz sonucu biyosensörün $y=0,7445x + 0,2075$ eşitliği için 0,02 – 5,0 mM arasında akım substrat miktarı arasında doğrusal ilişki olduğu ve duyarlılığı $1,5 \mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ olarak bulunmuştur. Biyosensörün LOD değeri 22,3 μM olarak hesaplanmıştır. Bu biyosensör için çizilen LB grafiğinden (Şekil 5.15d) $y=0,7626x + 0,1521$ eşitliği ile K_m ve I_{max} sırasıyla 5,01 mM ve 6,57 μA olarak hesaplanmıştır.

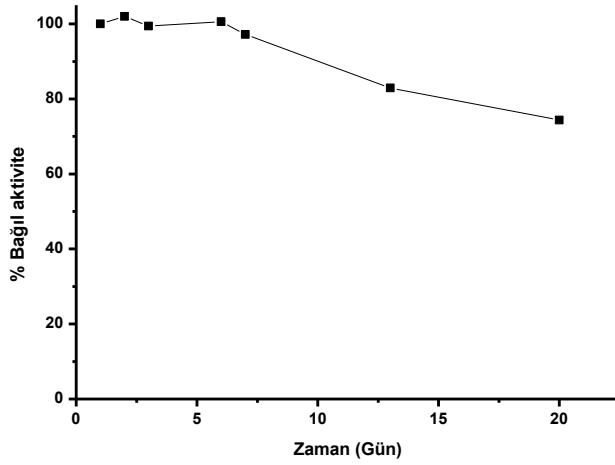


Şekil 4.15. Pt/P(SNS-An-ko-EDOT)/C60/GOX biyosensörünün 0,55 V'daki a) akım – zaman; b) akım değişimi - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri (0,55 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.2.3.1b. Raf ömrü

Pt/P(SNS-An-ko-EDOT)/C60/GOX biyosensörlerinin raf ömrü tayini için 0,55 V sabit potansiyel de aktiviteler 20 gün boyunca kontrol edilmiş ve Şekil 4.16

incelendiğinde biyosensörün 20. gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 70'i oranında cevap verdiği görülmüştür.



Şekil 4.16. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/C60/GOX biyosensörünün raf ömrü (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, 0,55 V, 1 mM glikoz, oda sıcaklığı)

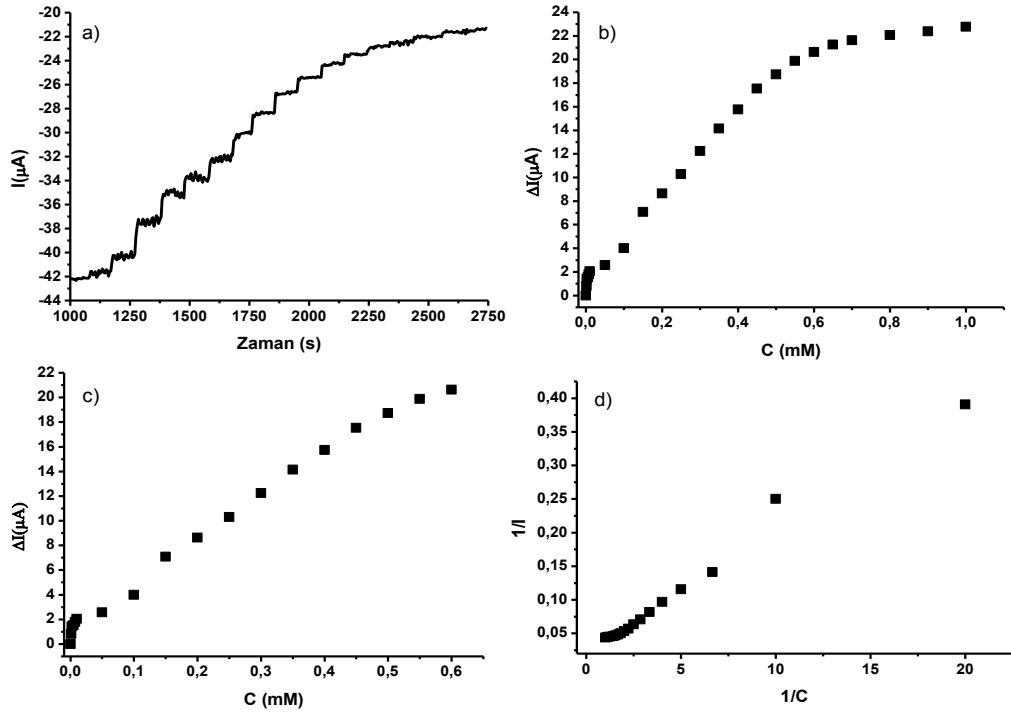
4.2.3.2. Biyosensörün analitik performansının oksijen ölçümüne bağlı olarak incelenmesi

4.2.3.2a. Kronoamperometrik bulgular

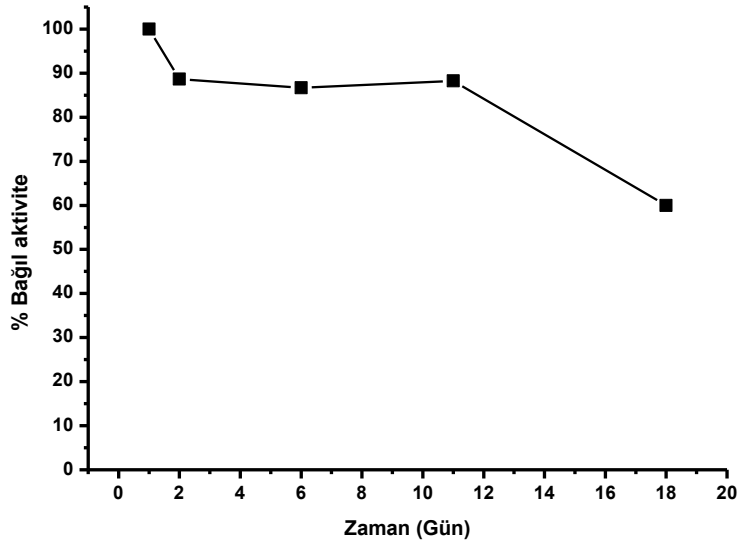
Şekil 4.17'de glikoz biyosensörü için -0,7 V sabit potansiyeldeki akım değişimine karşı glikoz derişimini gösteren kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Amperometrik analiz sonucu $y = 33,913x + 1,611$ ($R^2 = 0,989$) eşitliği için 0,025 – 0,6 mM arasında doğrusallık ve duyarlılık ise $67,82 \mu A / (mM.cm^2)$ olarak bulunmuştur. Biyosensörün LOD değeri $51,7 \mu M$ olarak hesaplanmıştır. LB grafiğinden (Şekil 4.17d) $y = 0,019x + 0,019$ ($R^2 = 0,986$), K_m 1 mM ve I_{max} ise $52,63 \mu A$ olarak hesaplanmıştır. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/C60/GOX biyosensör tasarımında fulleren etkisi incelendiğinde çok duvarlı karbon nanotüpe göre duyarlılığı düşük olduğu tespit edilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda karbon nanotüp kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2.3.2b. Raf ömrü

Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/C60/GOX biyosensörlerinin raf ömrü tayini için -0,7 V sabit potansiyelde aktiviteler 18 gün boyunca kontrol edilmiş ve Şekil 4.18 incelendiğinde biyosensörün 18. gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 60'ı oranında biyosensörün cevap verdiği görülmüştür.



Şekil 4.17. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/C60/GOX biyosensörünün -0,7 V’da **a)** akım – zaman; **b)** akım değişimi - glikoz derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (-0,7 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

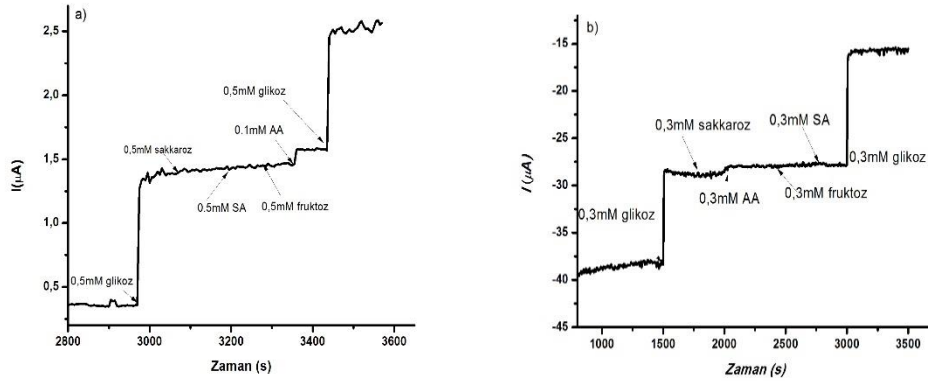


Şekil 4.18. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/C60/GOX biyosensörünün raf ömrü (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, - 0,70 V, 1 mM glikoz, oda sıcaklığı)

4.2.4. P(SNS-An) ve P(SNS-An -ko- EDOT) biyosensörlerinde girişim etkisi ve gerçek numune analizleri ile ilgili bulgular

Bilindiği gibi meyve suları gibi gerçek numunelerde glikoz ile birlikte askorbik asit (AA), sakkaroz, früktoz, sitrik asit (SA) gibi maddeler de bulunmaktadır. Biyosensörün glikozdan başka maddelere verdiği tepkinin incelenmesi amacı ile girişim etkisi çalışmaları yapılmıştır.

Bu çalışma için amperometrik ölçümler sırasında glikoz yerine bu maddeler çalışma hücrelerine eklenmiştir. Şekil 4.19 incelendiğinde askorbik asidin hidrojenperoksit takibi yapılan çalışmalarda % 11,7 ve oksijen takibi yapılan çalışmalarda % 4,4 girişim etkisi yaptığı saptanmıştır. Sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit için ise hem pozitif hem de negatif tarafta kayda değer cevap alınmamıştır. Bununla birlikte eşmolar glikoz eklenmesiyle, glikozdan dolayı açık bir şekilde sinyal gözlemlenmiştir. Biyosensörün -0,7 V da yapılan çalışmalarında başka maddeler varlığında bile glikoza karşı seçici davrandığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.19. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/GOX biyosensörünün **a)** 0,6 V; **b)** -0,7 V çalışma potansiyelinde askorbik asit (AA), sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit (SA) girişim etkisi

Meyve sularında yapılan glikoz analizi sonunda ölçülen amperometrik cevap akımlarına denk gelen derişim değerleri kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır. Tasarlanan biyosensörler ile Cappy Ramazan Şerbeti ve Tamek %100 elma suyu ticari meyve sularında glikoz tayini yapılmış ve referans metod ile genel olarak tutarlı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. İçeceklerde glikoz tayini

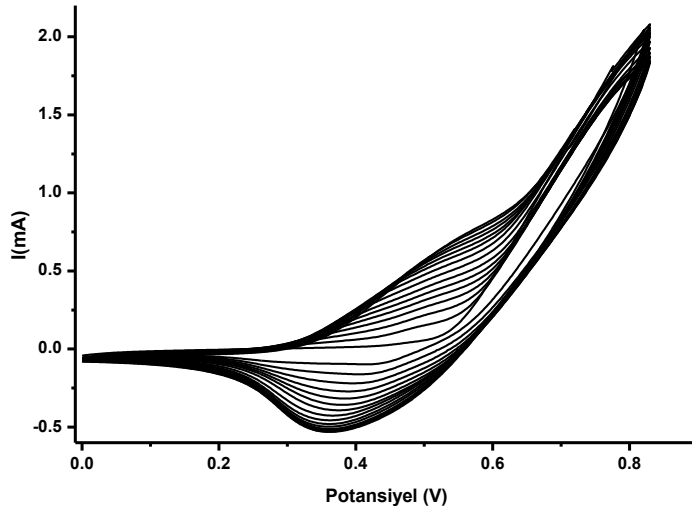
Örnek	Ramazan Şerbeti (mg/L)	G.K.	Elma suyu (mg/L)	G.K.
HPLC	30,250		15,720	
Pt/P(SNS-An-ko-EDOT)/CNT/GOX (0,6V)	31,43 ±1,36	103,1	16,24 ±1,25	103,3
Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX (0,7V)	31,128	102,9	15,466	98,4
Pt/P(SNS-An-ko-EDOT)/CNT/GOX (-0,7V)	29,97 ±3,9	99,0	16,02 ±0,6	102,0
Pt/P(SNS-An)/CNT/GOX (-0,7V)	44,12	146	26,43	168

GK: Geri kazanım

4.3. P(SNS-Et) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular

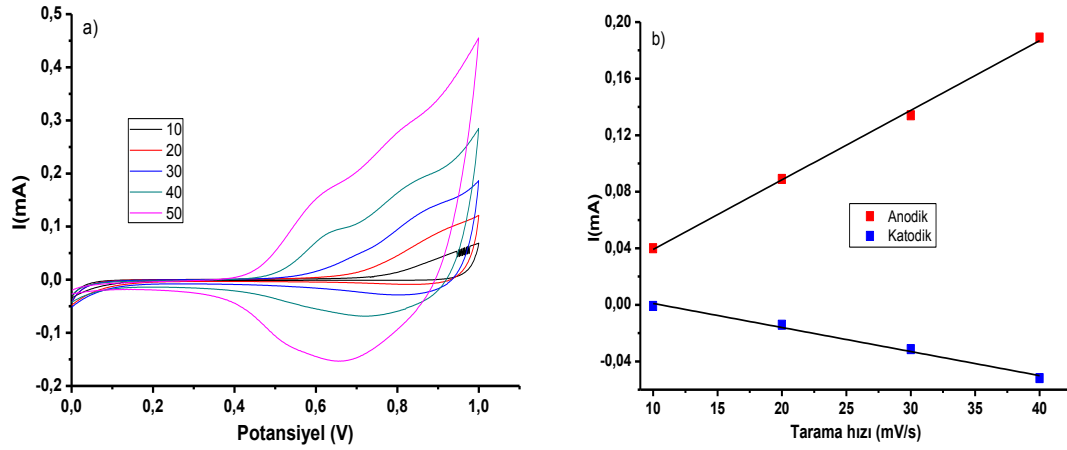
4.3.1. P(SNS-Et) sentezi

Şekil 4.20’de SNS-Et’ün LiClO₄/ACN içerisinde 100 mV/s tarama hızıyla kayıt edilen dönüşümlü voltamogramı verilmiştir. SNS-Et monomerinin yükseltgenme potansiyeli 0,85 V ve polimerin yükseltgenme ve indirgenme potansiyelleri sırasıyla 0,79 ve 0,65 V olarak belirlenmiştir. Grafikten görüleceği gibi her döngü de akım şiddetinin artması monomerin elektrot yüzeyinde polimerleştiğini göstermektedir. Optimum film kalınlığının belirlenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda potansiyometrik döngü sayısı 15, 20 ve 30 olarak değiştirilmiş ve 15’in üzerindeki döngü sayısının kaplama kalitesine olumsuz yönde etki yaptığı belirlenmiştir. Bu sebeple PSNS-Et sentezinde (0,0 – 0,9)V aralığında 15 döngünün optimum koşul olduğu kabul edilmiştir.



Şekil 4.20. SNS-Et’in ACN/LiClO₄ ortamında, 100 mV/s’deki dönüşümlü voltamogramı (Çalışma ve Karşıt elektrot: Pt levha, Pt tel, Referans elektrot: Ag/AgCl)

P(SNS-Et) homopolimerinin tarama hızı çalışmasından elde edilen Şekil 4.21’e bakıldığında tarama hızındaki artış ile akım yoğunluğunun doğrusal olarak arttığı görülmektedir. Literatür de bu durum, film yüzeyinde aktif merkezlerin olduğu ve redoks süreçlerinin difüzyon kontrollü olmadığını kanıtı olarak kabul edilmektedir.



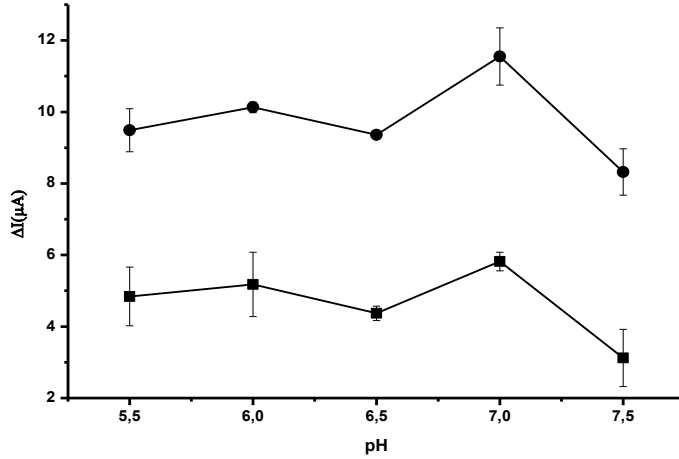
Şekil 4.21. ACN/LiClO₄ ortamında, **a)** P(SNS-Et)'in farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları; **b)** P(SNS-Et)'in anodik ve katodik akımların tarama hızı ile değişimi

4.3.2. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi

Bilindiği üzere, hazırlanan biyosensörün amperometrik cevabı H₂O₂'in yükseltgenmesi üzerinden takip edilebileceği gibi, enzimatik tepkimede harcanan O₂'nin indirgenmesi üzerinden de takip edilebilir. H₂O₂'in yükseltgenmesi üzerinden yapılan çalışmalarda duyarlılığın çok az olması ve verilerin tutarsız olmasından dolayı çalışmamızın bir sonraki aşamasında çalışma potansiyeli O₂'nin indirgenmesine ait olan -0,7 V olarak kullanılmıştır.

4.3.2.1. pH etkisi

Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörün aktivitesine ortam pH'nın etkisi araştırmak amacıyla çeşitli pH'larda (5,5 – 7,5) 0,1M fosfat tamponları hazırlanmıştır. Sabit 1 mM glikoz derişiminde daha önce hazırlanmış değişik pH fosfat tamponunun da -0,7 V sabit potansiyel uygulandığında kararlı haldeki akım değerleri ölçülerek ΔI'e karşı pH grafiğe geçirilmiştir. Grafik 4.22'de görüleceği gibi en yüksek değer pH=7,0'de elde edilmiş ve bu pH optimum değer olarak çalışmalarda kullanılmıştır.



Şekil 4.22. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörünün akım-pH grafiği (0,10 M fosfat tamponu, -0,70 V, oda sıcaklığı)

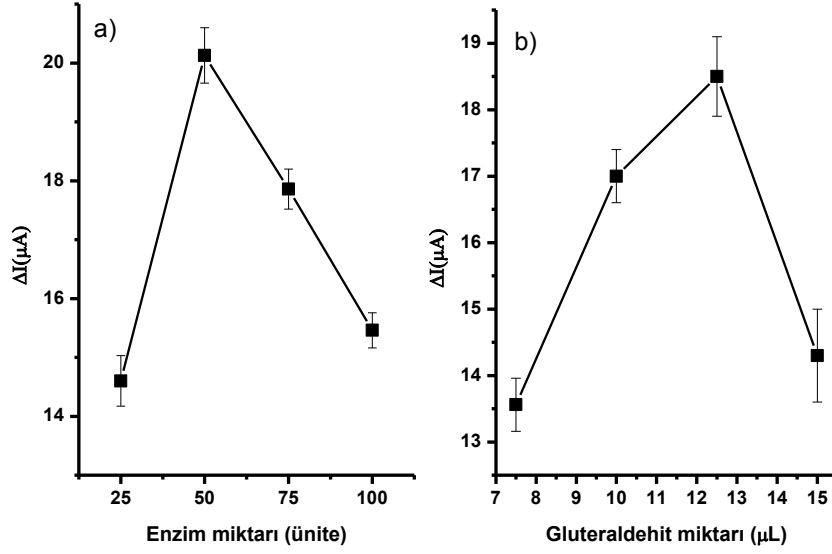
4.3.2.2. Enzim ve gluteraldehit miktarı etkisi

Yüzeğe tutunan enzim miktarı akım değişimini etkilediği için biyosensörün yapımında optimize edilmesi gereken önemli parametrelerden birisi enzim miktarıdır. Bu sebepten dolayı en uygun enzim miktarı belirlemek için diğer tüm etkenler sabit tutularak 25, 50, 75 ve 100 ünite GOX varlığında elektrotlar hazırlanmıştır. Elektrotlar uygun koşullarda dengeye getirildikten sonra ortama 0,5 mM glikoz eklenmiş ve gözlemlenen akım değişimleri kayıt edilmiştir. Şekil 4.23a'ya bakıldığında 50 U GOX enzimi ile hazırlanan elektrodun maksimum akım değişimi gösterdiği tespit edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda 50 ünite GOX enzimi ile elektrotlar hazırlanmıştır.

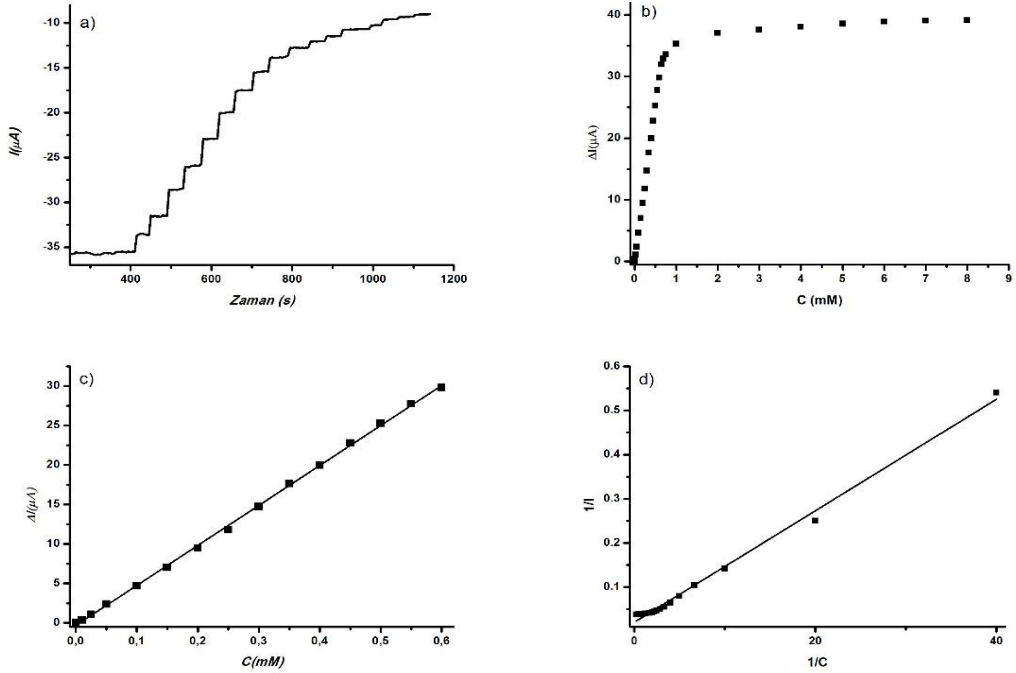
Gluteraldehit etkisini incelemek için diğer tüm etkenler sabit tutulmuş ve % 1 gluteraldehit çözeltisinden elektrotlar yüzeyine 7,5, 10, 12,5 ve 15 µL damlatılmıştır. Hazırlanan elektrotlar dengeye getirildikten sonra ortama 0,25 ve 0,5 mM glikoz eklenmiş ve kronoamperometrik cevapları kaydedilmiştir. Ölçülen akıma karşı gluteraldehit miktarı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.23b'de görüleceği gibi optimum gluteraldehit miktarı için %1'lik çözeltiden 12,5 µL kullanılması uygun bulunmuştur.

4.3.3. Kronoamperometrik bulgular

Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX çalışma elektrodu yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu tüketilen oksijenin indirgenmesine dayanılarak -0,7 V sabit potansiyelde Ag/AgCl referans elektroduna karşı ölçülmüştür. Glikoz biyosensörünün doğrusal aralığı $y = 50,628x - 0,307$ eşitliği ile 0,01 – 0,6 mM arasında ve duyarlılığı ise $101,26 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.24). LOD değeri 1,7 µM olan Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensör LB eşitliği $y = 0,0126x + 0,0203$ için K_m ve I_{max} değerleri sırasıyla 0,62 mM ve 48,92 µA olarak hesaplanmıştır.



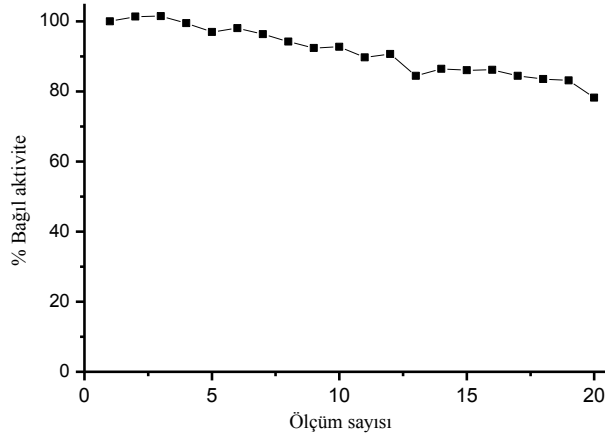
Şekil 4.23. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörünün **a)** akım-enzim miktarı; **b)** akım-gluteraldehit miktarı grafikleri (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,70 V, oda sıcaklığı)



Şekil 4.24. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörünün **a)** akım – zaman; **b)** akım - glikoz derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,70 V, oda sıcaklığı)

4.3.4. Kullanım kararlılığı

Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirlik bakımından değerlendirilmesi 25 °C'de bir günde 20 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Buna göre sekizinci ölçüm sonunda standart sapma $\pm 0,193$, varyasyon katsayısı 2,597 olarak bulunmuştur. 20 ölçüm sonunda standart sapma $\pm 0,531$ ve varyasyon katsayısı % 7,681 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma ile biyosensörün ard arda sekiz kez kullanılabilceği düşünülmüştür.

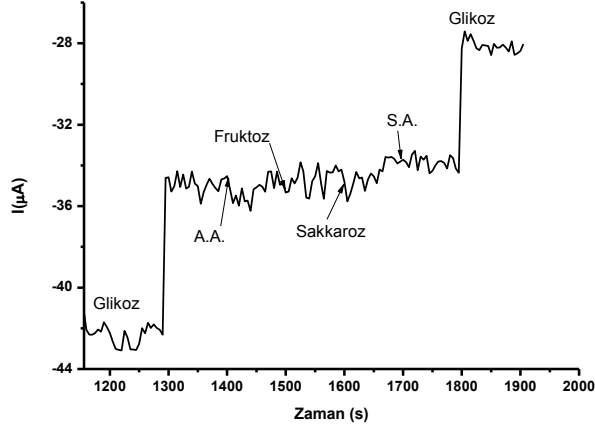


Şekil 4.25. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,10 M pH 7,0 fosfat td amponu, -0,70 V, 0,5 mM glikoz, oda sıcaklığı)

4.3.5. Girişim etkisi ve gerçek numune analizi ile ilgili bulgular

Biyosensörün glikozdan başka maddelere verdiği tepkinin incelenmesi amacı ile girişim etkisi çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışma için amperometrik ölçümler sırasında glikoz eklendikten sonra meyve sularında bulunan askorbik asit (AA), sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit (SA) çalışma hücrelerine eklenmiştir. Biyosensörün oksijen takibi yapılan çalışmalarda Şekil 4.26'da görüldüğü gibi girişim etkisi olmadığı saptanmıştır. Biyosensörün -0,7 V da yapılan çalışmalarında başka maddeler varlığında bile glikoza karşı seçici davrandığı tespit edilmiştir.

Ticari meyve sularının gerçek numune olarak kullanıldığı çalışmalarda ölçülen amperometrik cevap akımlarına denk gelen derişim değerleri kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Tasarlanan biyosensörler ile Cappy vişne ve Cappy karışık ticari meyve sularında glikoz tayini yapılmış ve -0,7 V potansiyelde referans metod ile tutarlı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.2.).



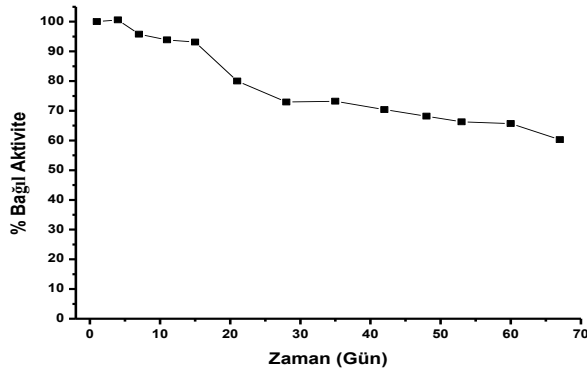
Şekil 4.26. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörüne askorbik asit (AA), sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit (SA) in girişim etkisi (-0,7V)

Çizelge 4.2. P(SNS-Et) ile hazırlanan biyosensörlerle içeceklerde glikoz tayini

Örnek	Vişne suyu (mg/L)	Geri kazanım	Karışık meyve suyu (mg/L)	Geri kazanım
HPLC	44,71±0,122		32,6±0,027	
Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX	44,297±1,24	99,08	32,387±0,91	99,08

4.3.6. Raf ömrü

Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü tayini için elektrodun aktivitesi -0,7 V sabit potansiyelde 67 gün boyunca takip edilmiştir. Şekil 4.27'de gösterildiği gibi ilk 15 günde çok az aktivite kaybı gerçekleşmiş ve 15 gün sonunda % 93 aktivite göstermiştir. Daha sonraki günlerde daha hızlı aktivite kaybı gözlenmiş ve 67 gün sonunda % 60 aktivite göstermeye devam etmiştir.

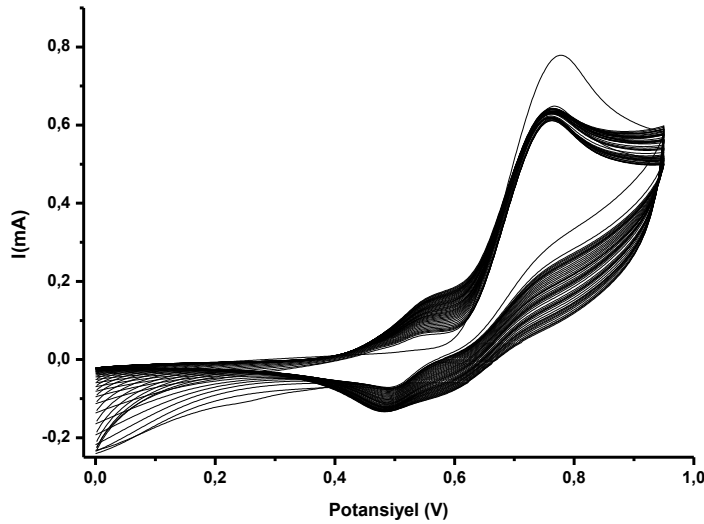


Şekil 4.27. Pt/P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,70 V, 0,5 mM glikoz, oda sıcaklığı)

4.4. P(SNS-HE) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular

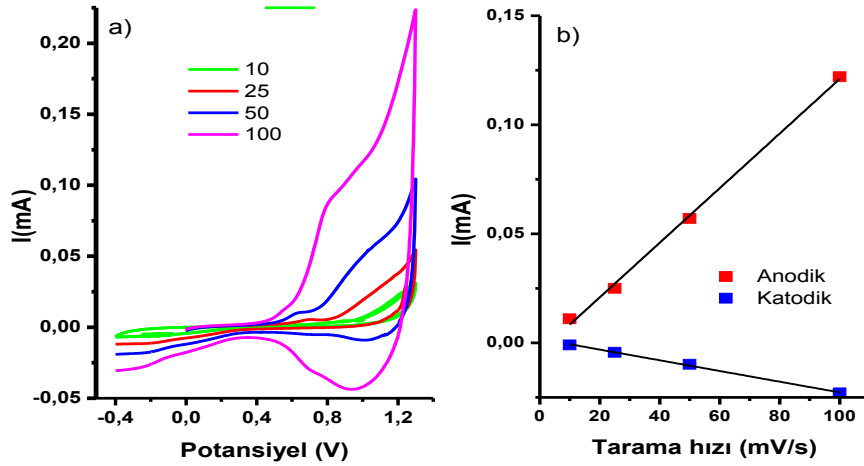
4.4.1. P(SNS-HE) sentezi

Şekil 4.28’de SNS-HE’in LiClO₄/ACN içerisinde 100 mV/s tarama hızıyla kayıt edilen dönüşümlü voltamogramı verilmiştir. SNS-HE monomerinin yükseltgenme potansiyeli 0,78 V, polimerin yükseltgenme ve indirgenme potansiyelleri sırasıyla 0,9 ve 0,94 V olarak belirlenmiş olup bu değerler literatür ile uyum içerisinde (Çamurlu 2011). Optimum film kalınlığının belirlenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda potansiyometrik döngü sayısı 20, 30, 40, 50 ve 60 olarak değiştirilmiş ve 50’in üzerindeki döngü sayılarının kaplama kalitesine olumsuz yönde etki yaptığı belirlenmiştir. Bu sebeple PSNS-HE sentezinde (0,0 – 1,0)V aralığında 50 döngünün optimum koşul olduğu kabul edilmiştir.



Şekil 4.28: SNS-HE'in ACN/LiClO₄ ortamında, 100 mV/s'deki homopolimerin dönüşümlü voltamogramları

Tarama hızı çalışması için monomersiz ortamda iletken polimer kaplı elektrotun - 0,4 – 1,3 V aralığında 10, 25, 50 ve 100 mV/s tarama hızıyla döngüsel voltametri çalışılmıştır (Şekil 4.29a). Polimerin yükseltgenme ve indirgenme potansiyellerindeki akım değerleri tarama hızı ile grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.29b’de P(SNS-HE)’nin tarama hızındaki artış ile akım yoğunluğunun doğrusal olarak arttığı görülmektedir. Literatürde bu durum, film yüzeyinde aktif merkezlerin olduğu ve redoks süreçlerinin difüzyon kontrollü olmadığına kanıt olarak kabul edilmektedir.



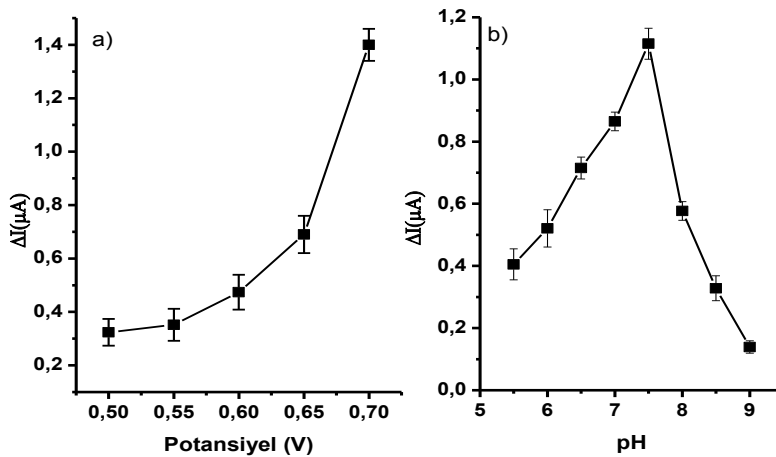
Şekil 4.29. ACN/LiClO₄ ortamında, a) P(SNS-HE)'in farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları; b) akım-tarama hızı grafikleri

4.4.2. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi

4.4.2.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi

Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün optimum potansiyelinin belirlenmesi için 0,5-0,7V aralığındaki potansiyellerde kronoamperometrik cevaplar kaydedilmiştir. Şekil 4.30'de görüleceği gibi cevapların 0,5 V'dan 0,7 V'a doğru arttığı saptanmış ve sonraki çalışmalarda 0,7 V kullanılmasına karar verilmiştir.

Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörüne pH etkisini incelemek için 5,5-9,0 pH aralığında farklı tamponlardaki 0,5 mM glikoze verilen cevaplar kaydedilmiştir. pH'a karşı akım değişimleri (ΔI) grafiğe geçirilmiş ve optimum pH değerinin 7,5 olduğu belirlenmiştir.

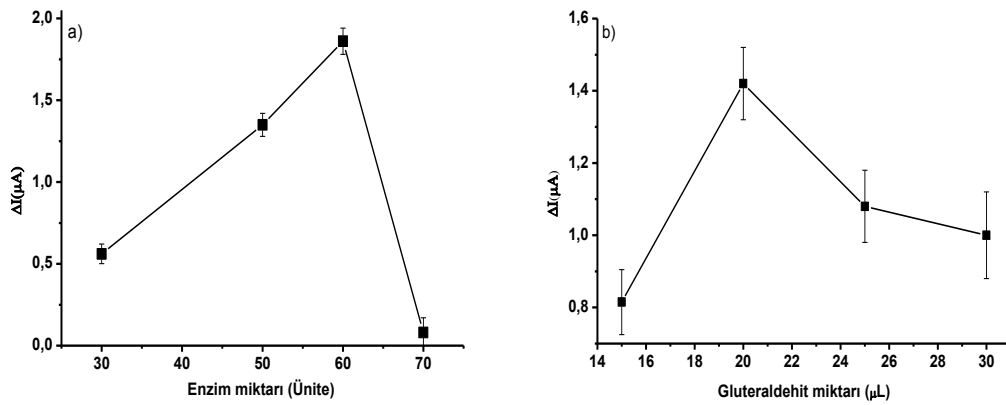


Şekil 4.30. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım-potansiyel; b) akım-pH grafikleri (0,10 M fosfat tamponu, 0,70 V, oda sıcaklığı)

4.4.2.2. Enzim ve glutraldehit miktarı etkisi

Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün performansına enzim miktarı etkisini incelemek için 30, 50, 60 ve 70 ünite enzim yüklenmiş elektrotların 0,5 mM glikoza verdikleri cevaplar kaydedilmiştir. Enzim miktarına karşı akım değerleri (ΔI) grafiğe geçirilmiş ve optimum enzim miktarının 60 ünite olduğu belirlenmiştir.

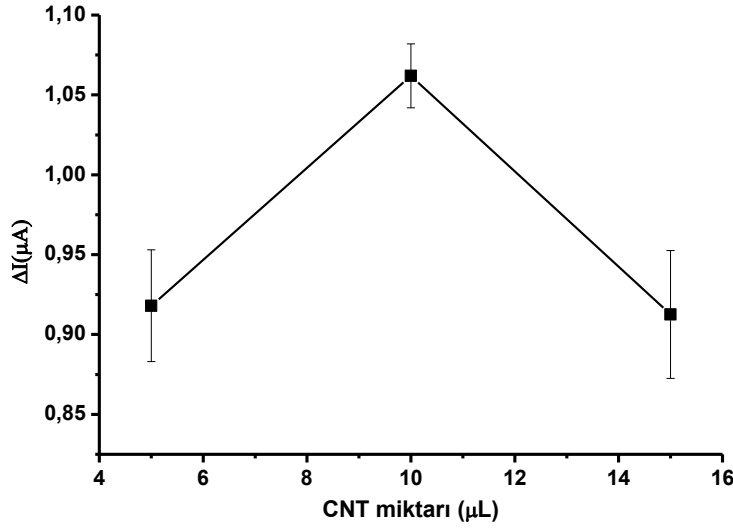
Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörüne eklenen çapraz bağlayıcı etkisini incelemek için daha önce % 1'lik çözeltisinden elektrot yüzeyine 15, 20, 25 ve 30 μL glutraldehit yüklenmiş ve elektrotların optimum ortamdaki 0,5 mM glikoza verdikleri cevaplar kaydedilmiştir. Çalışma sonucunda optimum glutraldehit miktarının 20 μL olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.31. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün **a)** akım-enzim miktarı; **b)** akım-glutraldehit miktarı grafikleri (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, 0,70 V, oda sıcaklığı)

4.4.2.3. CNT miktarı etkisi

Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensöründe kullanılan CNT miktarı etkisini incelemek için 1 mg/mL CNT/etanol karışımından 5, 10 ve 15 μL CNT yüklenmiş elektrotların 0,5 mM glikoza verdiği cevaplar kaydedilmiştir. CNT miktarına karşı akım değişimleri (ΔI) grafiğe geçirilmiş (Şekil 4.32) ve optimum CNT miktarının 10 μL olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.32. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün akım-CNT miktarı grafiği (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, 0,70 V, oda sıcaklığı)

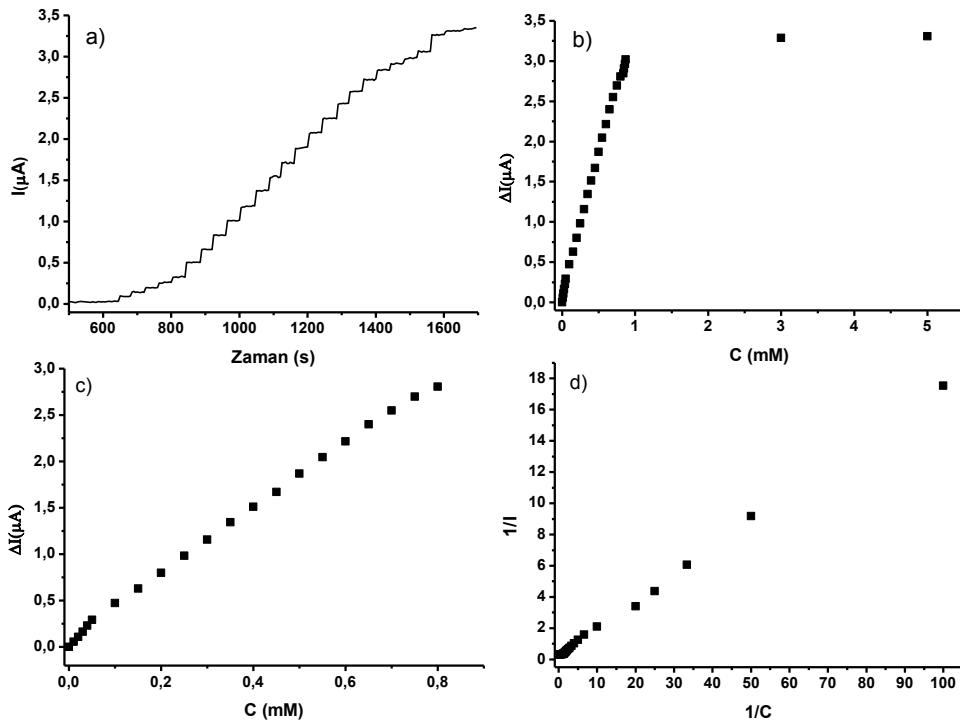
4.4.3. Biyosensörün analitik performansının hidrojenperoksit ölçümüne bağlı olarak incelenmesi

4.4.3.1. Kronoamperometrik bulgular

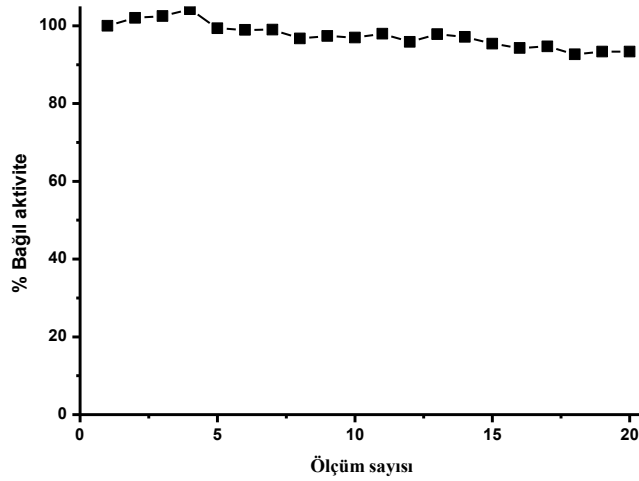
Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX çalışma elektrodu yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojenperoksitin yükseltgenmesine dayanılarak 0,7 V sabit potansiyelde Ag/AgCl referans elektroduna karşı ölçülmüştür. Biyosensörün katalitik akımı artan glikoz derişimiyle artmaktadır. Glikoz biyosensörünün cevapları $y=3,53x + 0,0786$ ($R^2=0,998$) eşitliğine uyduğu belirlenmiştir. Bu biyosensörün doğrusal aralığı 0,01 – 0,8 mM ve duyarlılığı $7,06 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.33). LOD değeri 1,85 μM olan Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün LB eşitliği $y=0,174x + 0,213$ ($R^2=0,998$) denklemine göre K_m ve I_{max} değerleri sırasıyla 0,82 mM ve 4,5 μA olarak bulunmuştur (Şekil 4.33).

4.4.3.2. Kullanım kararlılığı

Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörün 0,7 V'da tekrar kullanılabilirlik bakımından değerlendirilmesi oda koşullarında bir günde 20 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Alınan ölçümler sonucunda standart sapma $\pm 0,071$ ve varyasyon katsayısı % 3,24 olarak hesaplanmış ve elektrodun 20. kullanımda bile % 93 aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



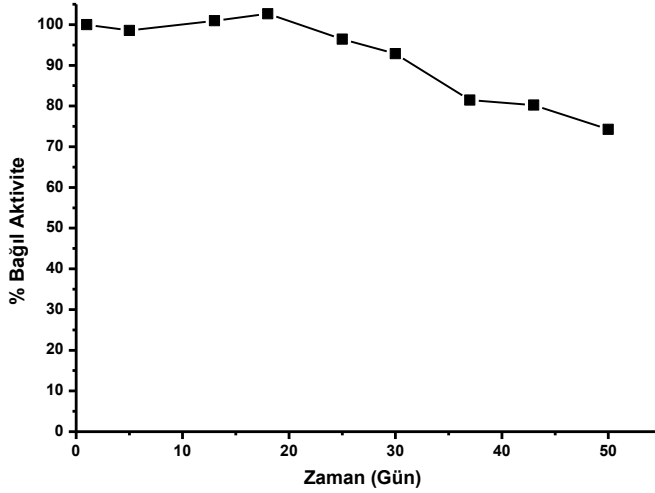
Şekil 4.33. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün **a)** akım–zaman; **b)** akım - glikoz derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, 0,70 V, oda sıcaklığı)



Şekil 4.34. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, 0,70 V, 0,5 mM glikoz, oda sıcaklığı)

4.4.3.3. Raf ömrü

Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörlerinin raf ömrü tayini için 0,7 V sabit potansiyelde aktiviteler 50 gün boyunca kontrol edilmiş ve Şekil 4.35 incelendiğinde biyosensörün 18. gün sonuna kadar başlangıç aktivitesini koruduğu daha sonra ise aktivite kaybettiği gözlemlenmiştir. Yedinci hafta sonunda biyosensör % 74 oranında aktivite göstermiştir.



Şekil 4.35. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, 0,70 V, 0,5 mM glikoz, oda sıcaklığı)

4.4.4. Biyosensörün analitik performansının oksijen ölçümüne bağlı olarak incelenmesi

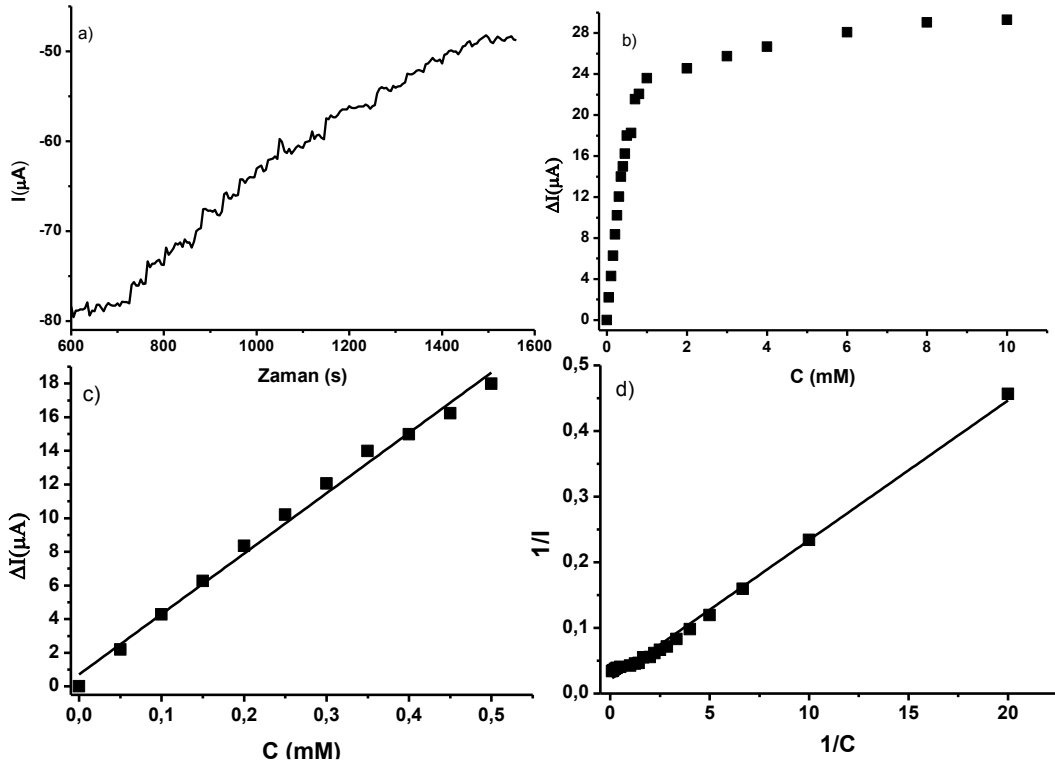
4.4.4.1. Kronoamperometrik bulgular

Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX çalışma elektrodu yüzeyindeki enzimatik reaksiyonda oksijenin indirgenmesine dayanılarak -0,7 V sabit potansiyelde Ag/AgCl referans elektroduna karşı ölçülmüştür. Glikoz biyosensörünün cevaplarının $y=35,88x + 0,714$ ($R^2=0,991$) eşitliğine uyduğu belirlenmiştir. Bu biyosensörün doğrusal aralığı 0,05 – 0,5 mM ve duyarlılığı $71,762 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.36). LOD değeri 19 μM olan Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün LB eşitliği $y=0,021x + 0,021$ ($R^2=0,993$) denklemine göre K_m ve I_{max} değerleri sırasıyla 1 mM ve 47,62 μA olarak bulunmuştur.

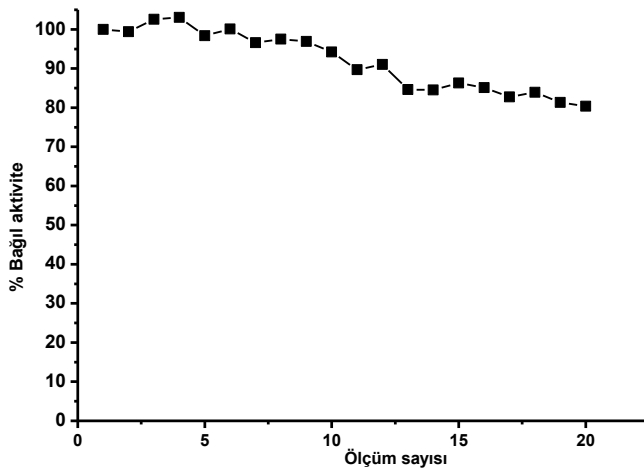
4.4.4.2. Kullanım kararlılığı

Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörün -0,7 V'da tekrar kullanılabilirlik bakımından değerlendirilmesi oda koşullarında bir günde 20 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Alınan 10 ölçüm sonucunda standart sapma $\pm 0,232$ ve varyasyon katsayısı % 2,77 olarak hesaplanmış ve elektrodun 20. kullanımda bile % 80 aktivite gösterdiği

tespit edilmiştir. Bu biyosensörün -0,7 V da 10 kez tekrar kullanılabileceği düşünülmüştür.



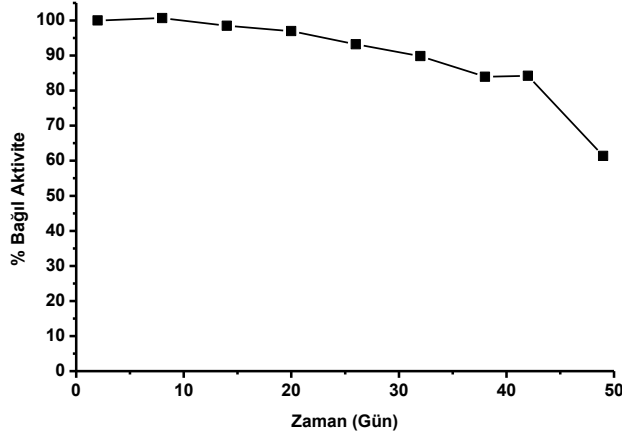
Şekil 4.36. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün **a)** akım – zaman; **b)** akım - glikoz derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, -0,70 V, oda sıcaklığı)



Şekil 4.37. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, -0,70 V, 0,5 mM glikoz, oda sıcaklığı)

4.4.4.3. Raf ömrü

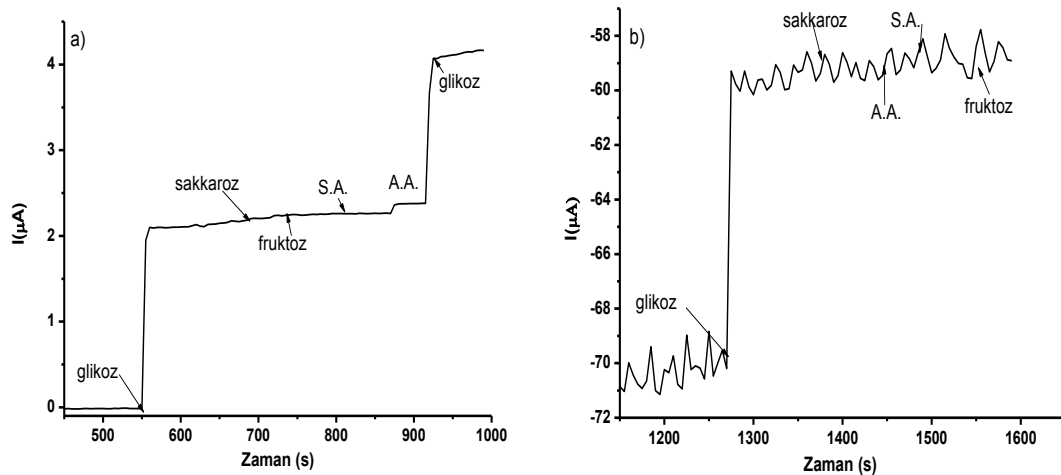
Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörlerinin raf ömrü tayini için $-0,7$ V sabit potansiyelde aktiviteler 49 gün boyunca kontrol edilmiş ve Şekil 4.38 incelendiğinde biyosensörün 14 gün boyunca başlangıç aktivitesini koruduğu, 7. hafta sonunda ise başlangıç aktivitesinin % 61 oranında cevap verdiği görülmüştür.



Şekil 4.38. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, $-0,70$ V, 0,5 mM glikoz, oda sıcaklığı)

4.4.5. Girişim etkisi ve gerçek numune analizi ile ilgili bulgular

Biyosensörün hidrojen peroksit takibi çalışmalarında sadece askorbik asite %5,6 oranında cevap verdiği ama diğer maddeler ile etkileşimde bulunmadığı görülmüştür. Biyosensörün oksijen takibi yapılan çalışmalarında Şekil 4.39'da görüldüğü gibi girişim etkisi olmadığı saptanmıştır. Biyosensörün $-0,7$ V'da yapılan çalışmalarında başka maddeler varlığında bile glikoza karşı seçici davrandığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.39. Pt/P(SNS-HE)/CNT/GOX biyosensörünün a) 0,7 V; b) $-0,7$ V çalışma potansiyelinde askorbik asit (AA), sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit (SA) girişim etkisi

Meyve sularında yapılan analizler sonunda ölçülen amperometrik cevap akımlarına denk gelen derişim değerleri ilgili denklemler kullanılarak hesaplanmıştır. Tasarlanan biyosensörler ile Cappy vişne, Cappy karışık ve Cappy ramazan şerbeti ticari meyve sularındaki glikoz tayini yapılmıştır. 0,7 V'da çalışmalarda askorbik asit etkisinden dolayı glikoz beklenilenden yüksek çıkmıştır. -0,7 V potansiyeldeki çalışmalar referans metot ile daha tutarlı sonuçlar vermiştir (izelge 4.3).

Çizelge 4.3. P(SNS-HE) ile hazırlanan biyosensörlerle içeceklerde glikoz tayini

Örnek	Vişne suyu (mg/L)	GK	Karışık meyve suyu (mg/L)	GK	Ramazan şerbeti (mg/L)	GK
HPLC	44,71±0,124		32,6±0,027		30,25	
Pt/P(SNS-HE) CNT/GOX 0,7 V	46,19±0,34	103,3	34,39±0,21	105,5	31,70±0,12	105,1
Pt/P(SNS-HE) CNT/GOX -0,7	44,18±1,43	98,8	32,99±0,98	101,2	31,21±1,09	103,2

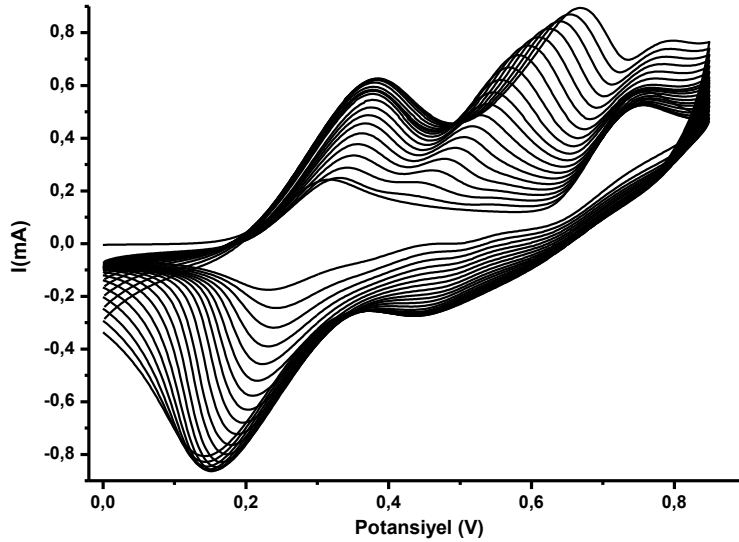
G.K: Geri kazanım

4.5. P(SNS-Fc) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular

Bu bölümde homopolimer üzerine hem CNT varlığında hem de CNT olmadan GOX immobilize edilmiş biyosensörler ile iki farklı potansiyelde çalışmalar yapılmıştır. Yani Pt/P(SNS-Fc)/GOX ve Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörlerinin hem 0,4 V hem de 0,6 V'daki performansları incelenmiştir. Bu noktada biyosensör cevabının medyatör ve H₂O₂ üzerinden takip edilmesi ve karşılaştırılması hedeflenmiştir.

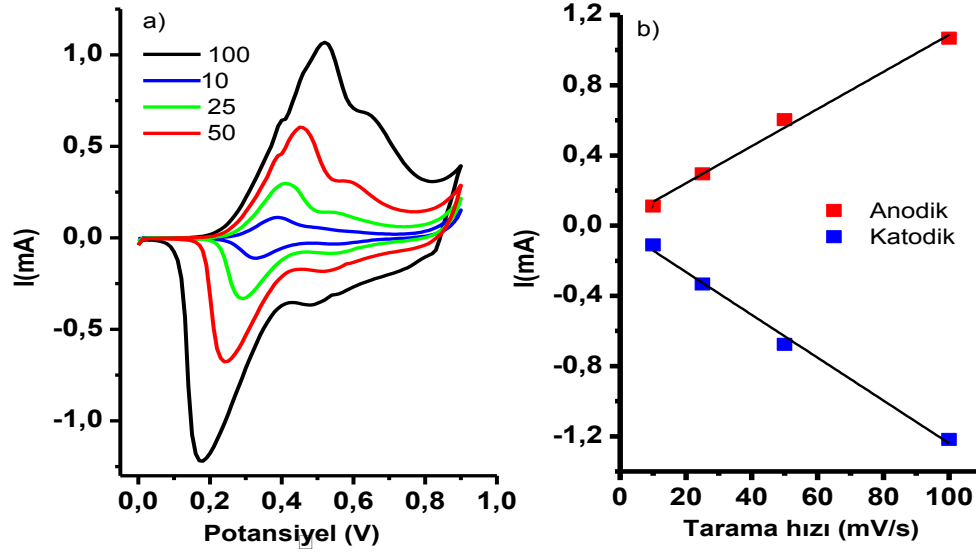
4.5.1. P(SNS-Fc) sentezi

Şekil 4.40'da SNS-Fc'nin LiClO₄/ACN içerisinde 100 mV/s tarama hızıyla kayıt edilen dönüşümlü voltamogramı verilmiştir. SNS-Fc monomerinin yükseltgenme potansiyeli 0,75 V olarak belirlenmiştir. Voltamogramda her döngü de akım şiddetinin artması monomerin elektrot yüzeyinde polimerleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.40. SNS-Fc'in ACN/LiClO₄ ortamında, 100 mV/s'deki dönüşümlü voltamogramı

Şekil 4.40'da verilmiş olan voltamogram ile monomerin yükseltgenme potansiyeli 0,75 V, ayrıca ferrosen biriminin yükseltgenme potansiyeli 0,32 V ve indirgenme potansiyeli ise 0,24 V olarak belirlenmiştir. Polimer zinciri üzerindeki ferrosen gruplarının sırası ile 0,52 V ve 0,17 V'da yükseltgenip indirgendiği ve polimerin yükseltgenme potansiyelinin 0,65 V ve polimerin indirgenme potansiyelinin 0,48 V olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. P(SNS-Fc)'in ACN/LiClO₄ ortamında, **a)** farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları; **b)** akım-tarama hızı grafikleri

P(SNS-Fc)'nin tarama hızı çalışmasına (Şekil 4.41b) bakıldığında tarama hızındaki artış ile akım yoğunluğunun doğrusal olarak arttığı görülmektedir. Literatürde tarama hızı ile akım yoğunluğunun doğrusal olması film yüzeyinde aktif merkezlerin varlığı ve difüzyon kontrollü olmadığını göstermektedir.

Optimum film kalınlığının belirlenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda potansiyometrik döngü sayısı 10, 15, 20 ve 25 olarak değiştirilmiş ve 20'in üzerindeki döngü sayısının kaplama kalitesine olumsuz yönde etki yaptığı belirlenmiştir. Bu sebeple PSNS-Fc sentezinde (0,0 – 0,9 V) aralığında 20 döngünün optimum koşul olduğu kabul edilmiştir.

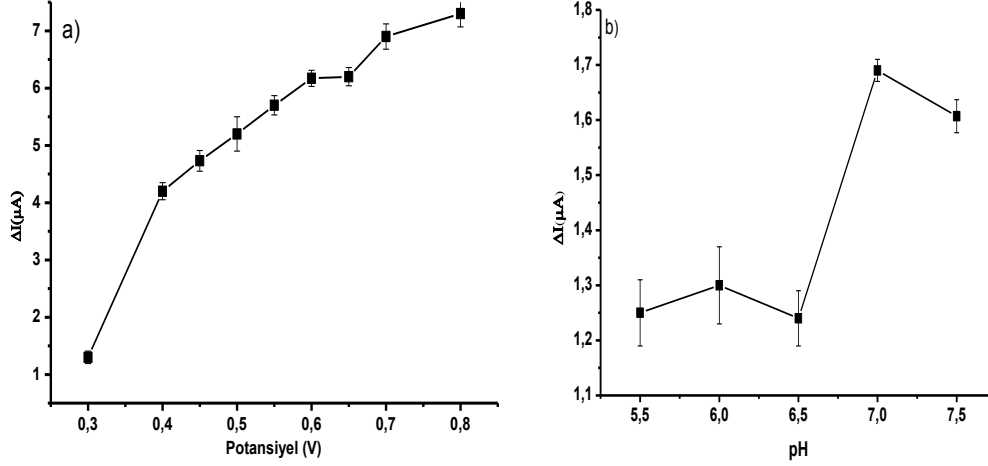
4.5.2. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi

4.5.2.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi

Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün optimum potansiyeli için 0,3-0,8 V aralığındaki potansiyellerde kronoamperometrik cevaplar kaydedilmiştir. Şekil 4.42a'da görüleceği gibi cevaplar 0,3 V'dan 0,8 V'a doğru arttığı saptanmış ve sonraki çalışmalarda 0,6 V kullanılmasına karar verilmiştir. Ancak, biyosensörün 0,6 V'da gözlemlenen girişim etkisini bertaraf etmek için 0,4 V'da da çalışmalar yapılmıştır. Dolayısı ile SNS-Fc homopolimer içeren çalışmalar hem medyatör (0,4 V) hem de H₂O₂ (0,6 V) takibine dayalı olarak çalışmalar yapılmıştır.

Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün aktivitesine ortam pH'nın etkisi araştırmak amacıyla çeşitli pH'larda (5,5 – 7,5) 0,1 M fosfat tamponları hazırlanmıştır. Sabit 0,5 mM glikoz derişiminde daha önce hazırlanmış değişik pH fosfat tamponunda

0,4 V sabit potansiyel uygulandığında kararlı haldeki akım değerleri ölçülerek ΔI 'ya karşı pH grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.42b). Grafikten görüleceği gibi en yüksek değer optimum pH 7,0 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.42. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörü için **a)** akım-potansiyel; **b)** akım- pH grafikleri (oda koşullarında, 0,5 mM glikoz, 0,1 M fosfat tamponu)

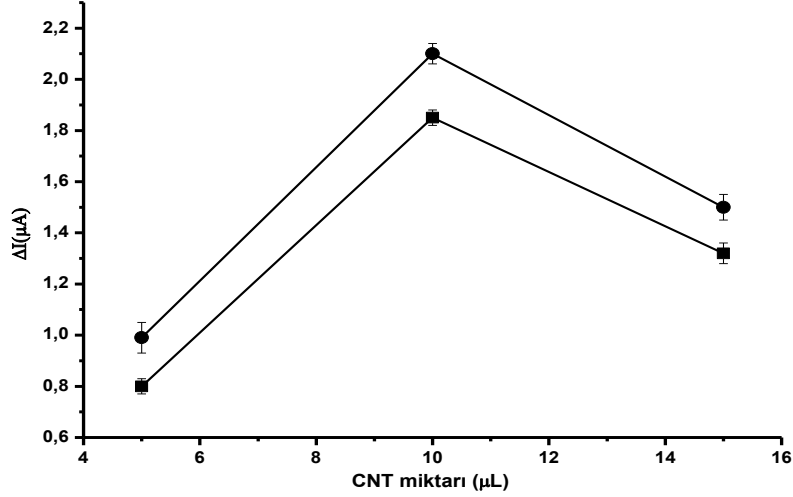
4.5.2.2. CNT miktarı etkisi

Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensöründe kullanılan CNT miktarı etkisini incelemek için daha önce hazırlanan 1 mg/mL CNT/etanol karışımından 5, 10 ve 15 μL CNT yüklenmiş elektrotların optimum ortamda 0,4 V ve 0,6 V sabit potansiyeldeki 0,5 mM glikoza verilen cevapları kaydedilmiştir. CNT miktarına karşı akım değişimleri (ΔI) grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.43) ve uygun CNT miktarının 10 μL olduğu belirlenmiştir.

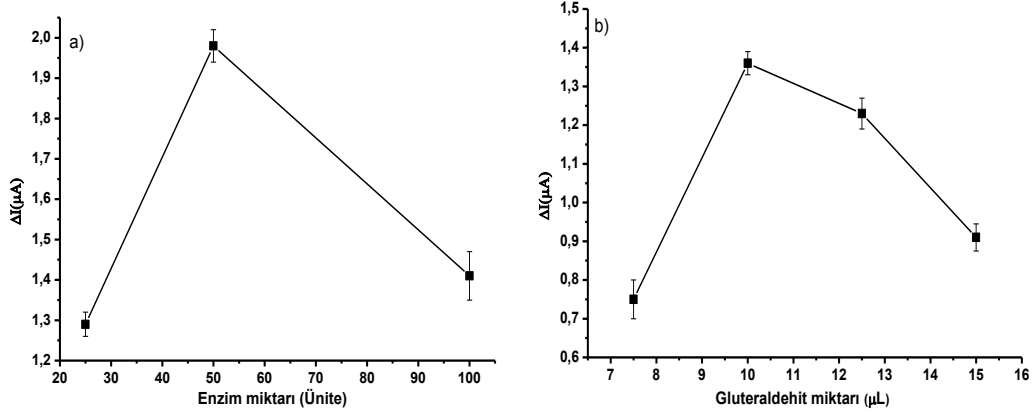
4.5.2.3. Enzim ve gluteraldehit miktarı etkisi

Bu tezde GOX enziminin immobilize edilmesiyle amperometrik glikoz biyosensör tasarlanmıştır. Biyosensörün yapımında optimize edilmesi gereken önemli parametrelerden birisi de enzim miktarıdır. Yüze tutunan enzim miktarı akım değişimini etkilemektedir. Bu sebeple en uygun enzim miktarı belirlemek için diğer tüm etkenler sabit tutularak 25, 50 ve 75 ünite GOX varlığında elektrotlar hazırlanmıştır. Şekil 4.44a'ya bakıldığında 50 U GOX enzimi ile hazırlanan elektrodun maksimum akım değişimi gösterdiği tespit edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda 50 ünite GOX enzimi ile elektrotlar hazırlanmıştır. Enzim miktarının artmasıyla akım değerlerinin azalması literatürde şöyle açıklanmaktadır; enzim miktarı artırıldığında enzim tabakası kalınlaşarak substrat ile etkileşmesi azalır ve böylece elektron transferi azalır.

Gluteraldehit etkisini incelemek için diğer tüm etkenler sabit tutulmuş ve % 1 gluteraldehit çözeltisinden elektrotlar yüzeyine 7,5, 10, 12,5 ve 15 μL damlatılmıştır. Hazırlanan elektrotlar dengeye getirildikten sonra ortama 0,5 mM glikoz eklenmiş ve kronoamperometrik cevapları kaydedilmiştir. Ölçülen akıma karşı gluteraldehit miktarı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.44b’de görüleceği gibi optimum gluteraldehit olarak %1’lik çözeltiden 10 μL kullanılması olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.43. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensöründe CNT miktarının amperometrik cevaba etkisi (oda koşullarında, pH=7,0, 50U enzim miktarı, 0,5 mM glikoz, (■)0,4 ve (●)0,6 V, 0,1 M fosfat tamponu)

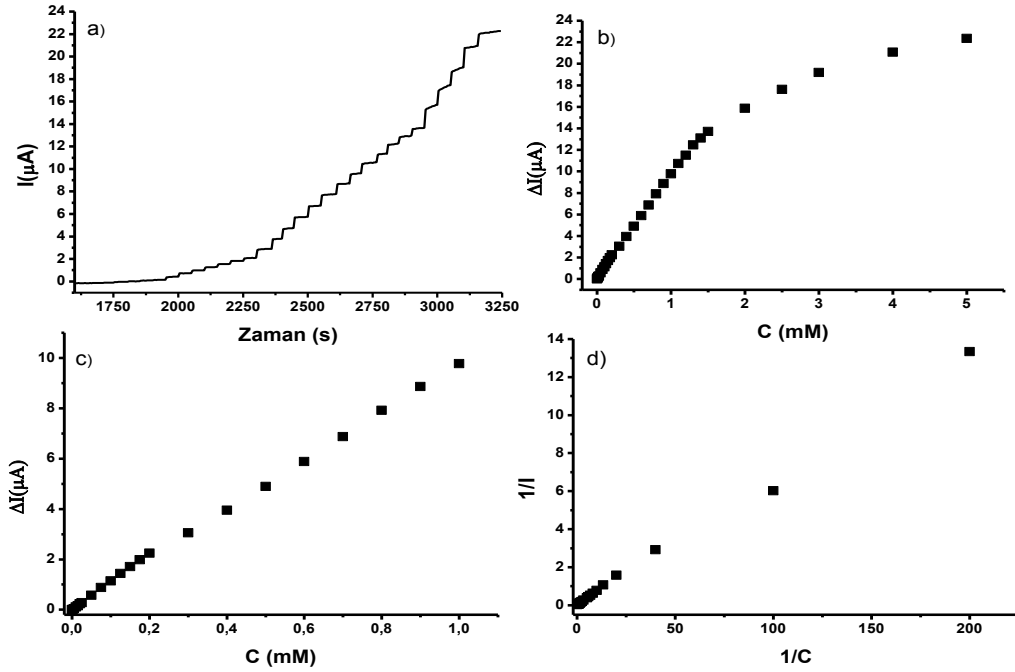


Şekil 4.44. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım- enzim miktarı; b) akım-gluteraldehit miktarı grafikleri (oda koşullarında, pH=7,0, 10 μL CNT miktarı, 0,5 mM glikoz, 0,4 V, 0,1 M fosfat tamponu)

4.5.3. P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kronoamperometrik bulguları

Çalışma elektrodu yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit 0,6 V sabit potansiyelde Ag/AgCl referans elektroduna karşı ölçülmüştür. Şekil 4.45'de glikoz biyosensörün 0,6 V sabit potansiyelde her glikoz eklenmesinden sonraki akım değerlerinin zamana karşı grafiği verilmiştir. Biyosensörün katalitik akımı artan glikoz derişimiyle artığı gözlenmiştir.

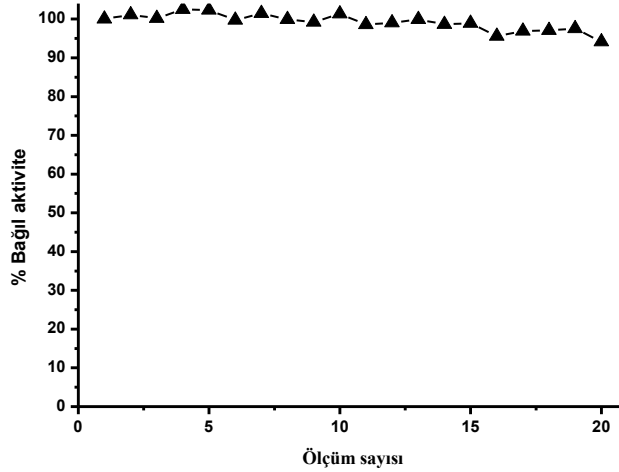
Şekil 4.45'de Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,6 V sabit potansiyel için $y=9,732x + 0,094$ ($R^2=0,999$) eşitliği ile verilen doğrusal aralığı 0,01 – 1,0 mM olarak bulunmuştur. Ayrıca, biyosensör duyarlılığı ve LOD değeri sırasıyla $19,46 \mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ ve $0,43 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Buna göre Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörün LB eşitliği $y=0,0655x + 0,040$ ($R^2=0,997$) olarak bulunmuş ve K_m , I_{max} değerleri sırasıyla 1,63 mM ve $24,94 \mu\text{A}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.45. Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,6 V'daki a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri (0,6 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.5.4. P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kullanım kararlılığı

Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirlikleri bakımından değerlendirilmesi 25°C 'de 0,6 V potansiyel uygulanarak bir günde ard arda 20 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Alınan ölçümler sonucunda standart sapma $\pm 0,133$ ve varyasyon katsayısı % 2,12 ($n=20$) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.46'da görüldüğü üzere Pt/P(SNS-Fc)/GOX elektrodu yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup 20. kullanımda bile % 94 aktivite göstermektedir.



Şekil 4.46. Pt/P(SNS-Fc) /GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,6 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.5.5. P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kronoamperometrik bulguları

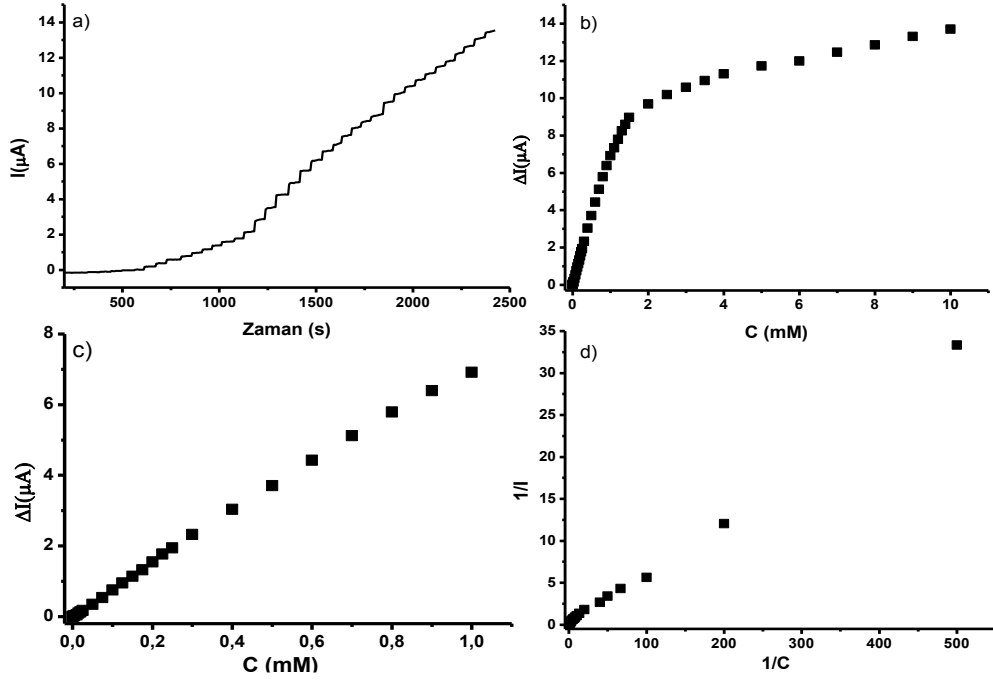
Şekil 4.47'de Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,4 V'da $y=7,12x + 0,05$ ($R^2=0,998$) eşitliği için doğrusal aralığı 0,01 – 1,0 mM arasında bulunmuştur. Ayrıca, biyosensör duyarlılığı ve LOD değeri sırası ile $14,22 \mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ ve $0,61 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Buna göre Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörü LB eşitliği $y=0,065x + 0,147$ ($R^2=0,997$) için K_m ve I_{max} sırasıyla $0,44 \text{ mM}$ ve $6,8 \mu\text{A}$ olarak bulunmuştur. Michaelis-Menten sabitinin küçük olması enzimin substrata karşı ilgisinin büyük olduğunu göstermiştir.

4.5.6. P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kullanım kararlılığı

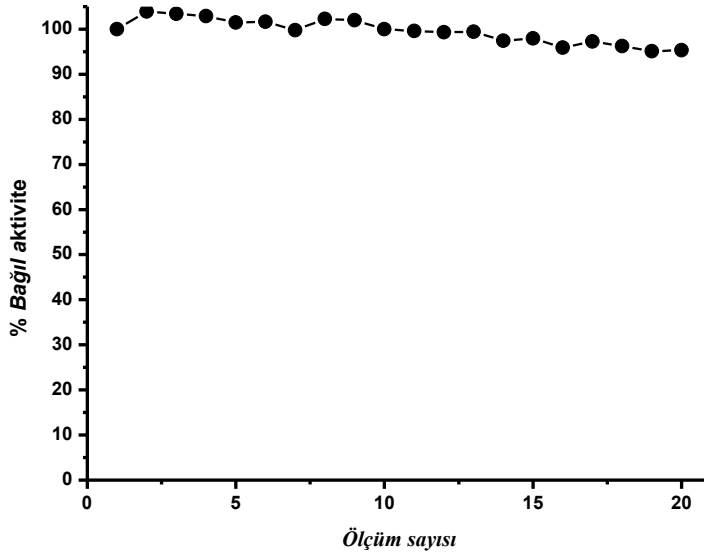
Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirlik bakımından değerlendirilmesi 25 °C'de 0,4 V potansiyel uygulanarak bir günde 20 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Alınan ölçümler sonucunda standart sapma $\pm 0,091$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 2,76 (n=20) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.48'de görüldüğü üzere Pt/P(SNS-Fc) /GOX elektrodu yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup 20. kullanımda bile % 96 aktivite göstermiştir.

4.5.7. P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki raf ömrü

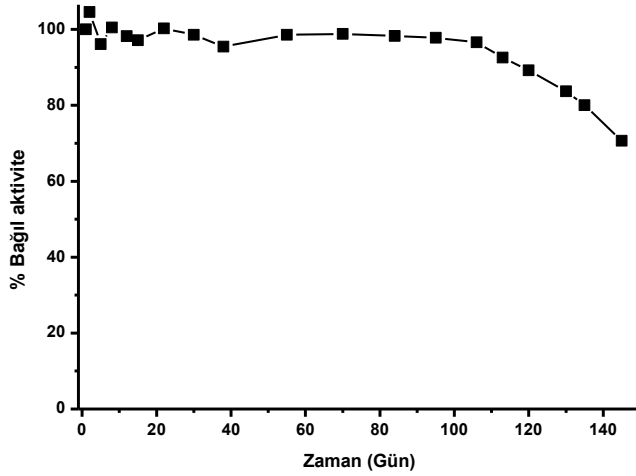
Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörlerinin raf ömrü tayini için 0,4 V sabit potansiyel de aktiviteler haftada bir kontrol edilmiş ve 145 gün boyunca aktivitelerinin kontrolüne devam edilmiştir. Şekil 4.49 incelendiğinde biyosensörün 106. gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 97 oranında cevap verdiği ve yirmibirinci hafta (145. gün) sonunda ise % 71 aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.47. Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün 0,4 V'daki **a)** akım – zaman; **b)** akım - glikoz derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)



Şekil 4.48. Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)



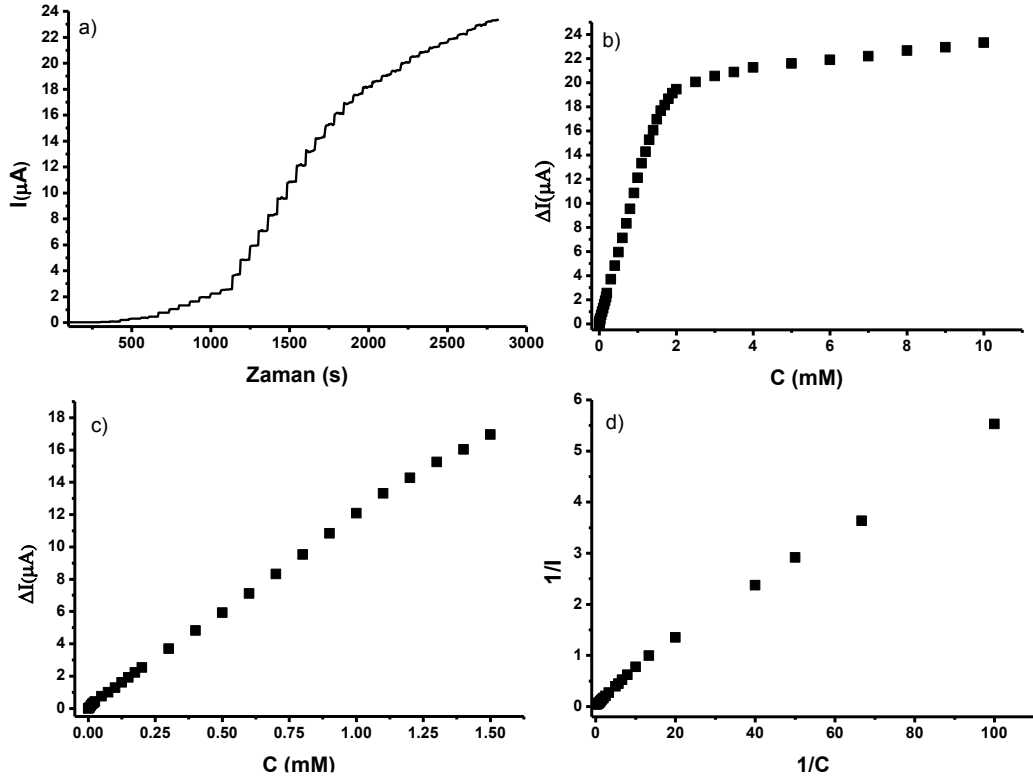
Şekil 4.49. Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.5.8. P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kronoamperometrik bulguları

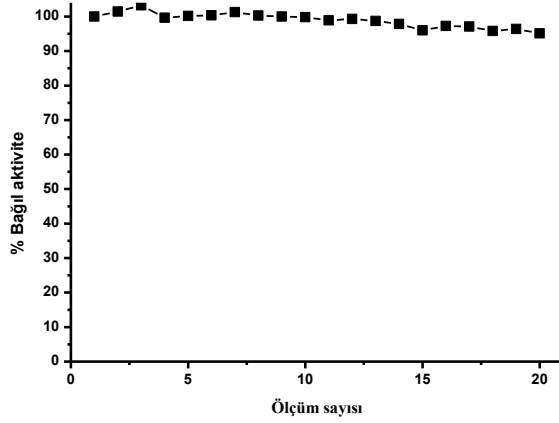
Şekil 4.50'de Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V sabit potansiyelde glikoz derişimi artkça akım değerinin artđı görülmüştür. Biyosensör $y=11,608x + 0,142$ ($R^2=0,999$) eşitliği için doğrusal aralık 0,01 – 1,5 mM arasında bulunmuştur. Ayrıca biyosensör duyarlılığı ve LOD değeri sırası ile 23,12 $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ ve 1 μM olarak bulunmuştur. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörü LB eşitliği $y=0,0553x + 0,0685$ ($R^2=0,996$) için K_m ve I_{max} sırasıyla 0,8 mM ve 14,7 μA olarak bulunmuştur.

4.5.9. P(SNS-Fc)CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kullanım kararlılığı

Alınan lmler sonucunda standart sapma $\pm 0,261$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 4,37 ($n=20$) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.51'de görüldüğü üzere Pt/P(SNS-Fc) /GOX elektrodu 20. kullanımda bile % 95 aktivite göstermektedir.



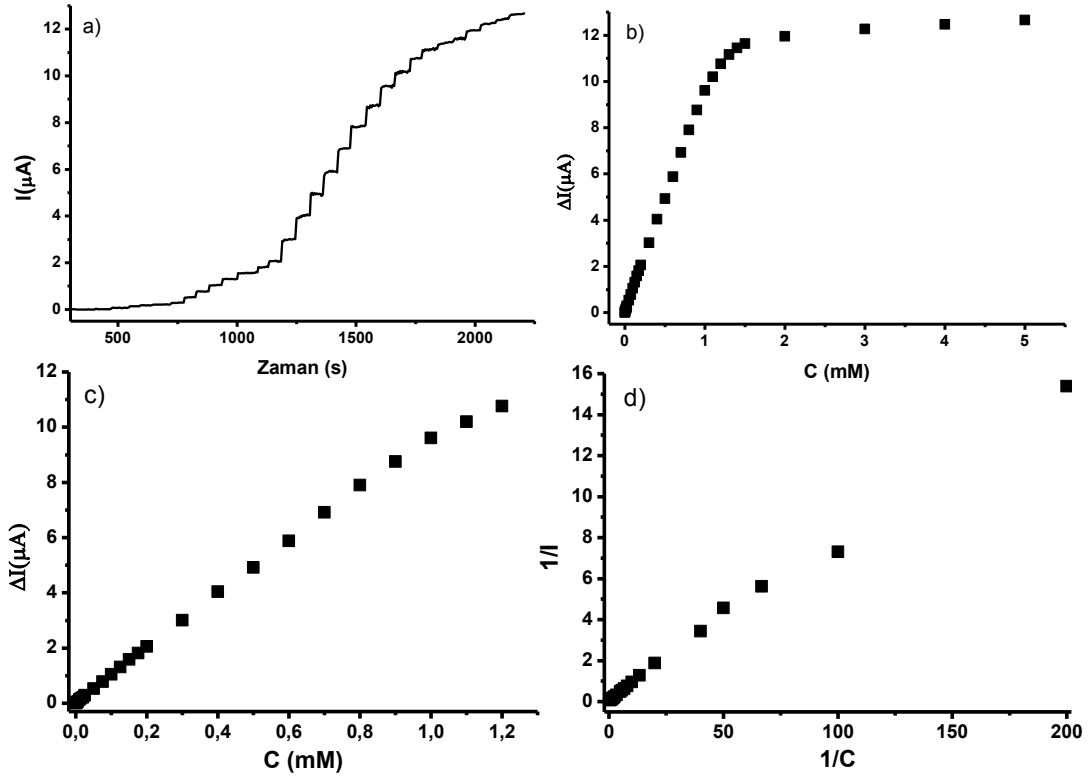
Şekil 4.50. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V'daki a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri (0,6 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)



Şekil 4.51. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,6 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.5.10. P(SNS-Fc)CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V'daki kronoamperometrik bulguları

Şekil 4.52'de Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V sabit potansiyel için kalibrasyonu $y = 9,367x + 0,119$ ($R^2=0,998$) eşitliği ile verilen doğrusal aralık 0,01 – 1,2 mM olarak bulunmuştur. Ayrıca, biyosensörün duyarlılığı $18,73 \mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ olarak bulunmuştur. Sinyal/gürültü oranı 3 olarak değerlendirildiğinde, LOD değeri $0,7 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.52d'e görülebileceği gibi Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörü LB eşitliği $y=0,0769x + 0,1092$ ($R^2=0,996$) için K_m ve I_{max} sırasıyla $0,76 \text{ mM}$ ve $9,17 \mu\text{A}$ olarak bulunmuştur.



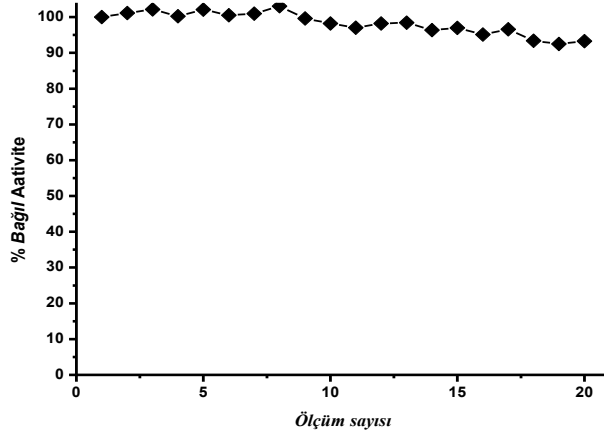
Şekil 4.52. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V'daki a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.5.11. P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V'daki kullanım kararlılığı

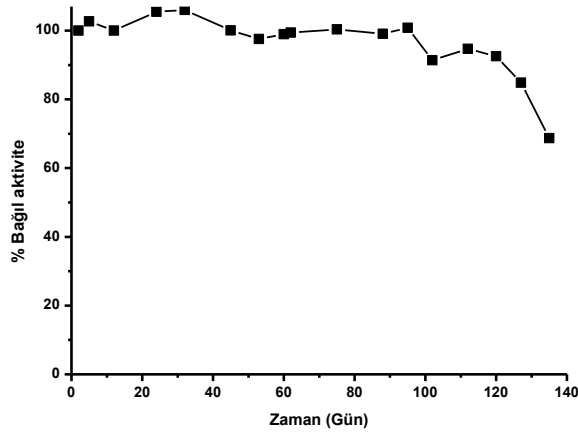
Alınan ölçümler sonucunda standart sapma $\pm 0,125$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 3,02 ($n=20$) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.53'de görüldüğü üzere Pt/P(SNS-Fc)CNT/GOX elektrodu yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup 20. kullanımda bile % 93 aktivite göstermektedir.

4.5.12. P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki raf ömrü

Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörün raf ömrü tayini için 0,4 V sabit potansiyel de biyosensör haftada bir kontrol edilmiş ve 135 gün boyunca aktivitelerinin kontrolüne devam edilmiştir. Şekil 4.54 incelendiğinde biyosensörün 112. gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 94'ü oranında cevap verdiği ve ondokuz hafta (135. gün) sonunda ise % 69 aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.53. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

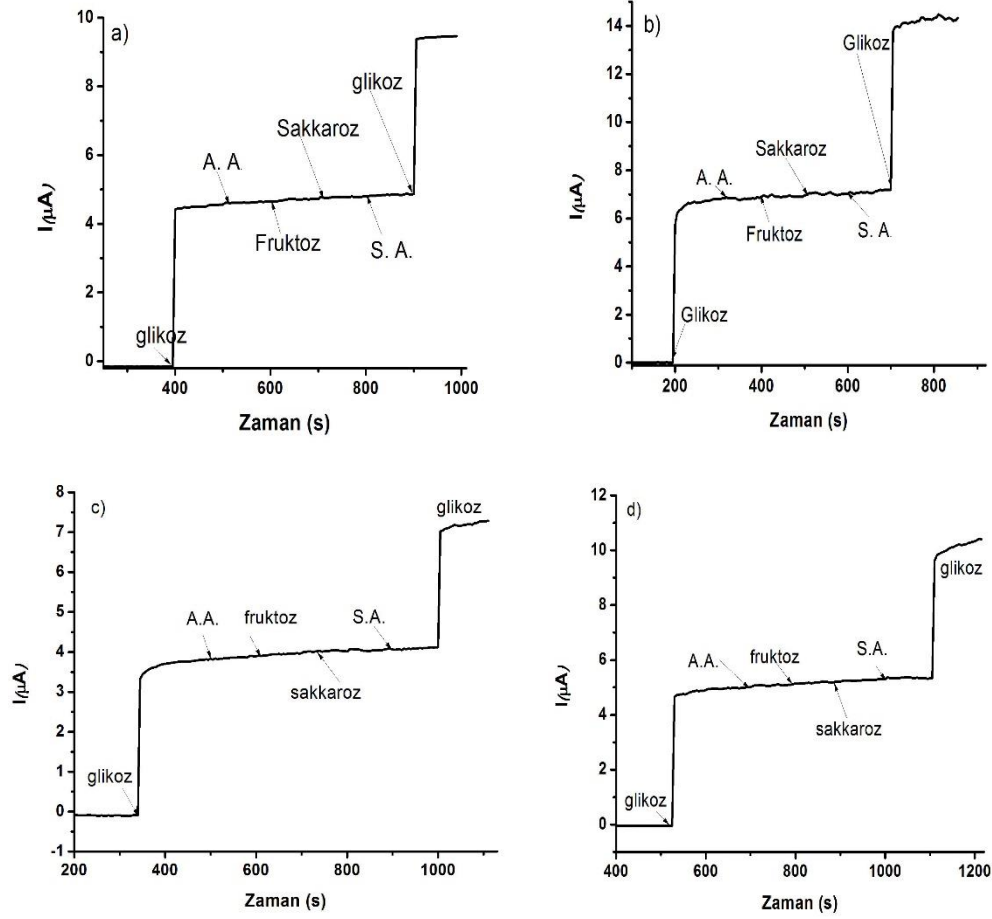


Şekil 4.54. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.5.13. Girişim etkisi ile ilgili bulgular

Biyosensörün, glikozdan başka maddelere verdiği tepkimenin değerlendirilmesi amacı ile girişim çalışması yapılmıştır. Bu etkiyi belirlemek için, 0,1 mM – 0,5 mM derişim aralığında askorbik asit, sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit gibi türlerin etkileşimleri çalışılmıştır. Bu maddelerden sakkaroz, fruktoz ve sitrik asitin anlamlı etkileşimi olmadığı görülmüştür. Buna karşın P(SNS-Fc) biyosensörünü 0,4 V'da % 1,5 iken 0,6 da

%4,1 askorbik aside tepki verdiği görülmüştür. P(SNS-Fc)/CNT ise 0,4 V için % 2,1 ve 0,6 V için % 4,6 askorbik etkisi olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.55).



Şekil 4.55. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX biyosensörünün **a)** 0,6 V; **b)** 0,4 V’da ve Pt/P(SNS-Fc)/GOX biyosensörün, **c)** 0,4 V; **d)** 0,6 V’da askorbik asit, sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit girişim etkisi

4.5.14. Gerçek numune analizi ile ilgili bulgular

Meyve sularında yapılan glukoz analizi sonunda ölçülen amperometrik cevap akımlarına denk gelen derişim değerleri kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır. Tasarlanan biyosensörler ile Cappy vişne, Cappy karışık ve Tamek % 100 elma suyu ticari meyve sularında glukoz tayini yapılmış ve 0,4 V’da referans metot ile tutarlı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. P(SNS-Fc) ile hazırlanan biyosensörlerle içeceklerde glikoz tayini

Örnek	Vişne suyu (mg/L)	GK	Elma suyu (mg/L)	GK	Karışık meyve suyu (mg/L)	GK
HPLC	43,2 ±0,12		15,72		32,3 ±0,03	
P(SNS-Fc)/CNT/GOX 0,6V	58,14 ±1,53	134,6	19,1 ±0,9	121,6	49,8 ±3,7	153,8
P(SNS-Fc)/CNT/GOX 0,4V	41,98 ±1,03	97,2	15,38 ±0,35	97,84	32,23 ±0,84	99,8
P(SNS-Fc)/GOX 0,6V	53,1 ±1,23	122,9	19,10 ±1,1	121,5	37,84 ±0,57	117,2
P(SNS-Fc)/GOX 0,4V	45,7 ±1,17	105,8	15,84 ±0,23	100,8	31,1 ±0,82	96,3

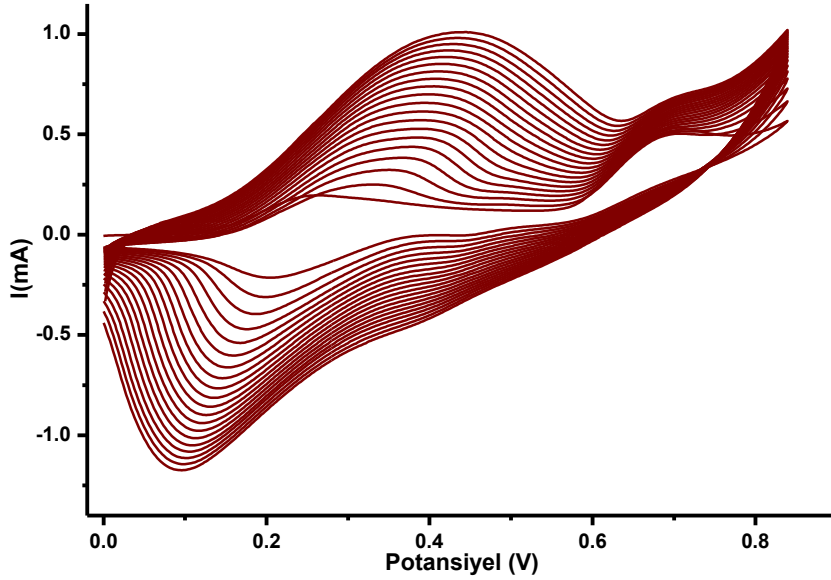
GK: Geri kazanım

4.6. P(SNS-Fc -ko- EDOT) Tabanlı Glikoz Biyosensörleri ile ilgili Bulgular

Bu bölümde kopolimer üzerine hem CNT varlığında hem de CNT olmadan GOX immobilize edilmiş biyosensörler ile iki farklı potansiyelde (0,6 ve 0,4 V) çalışmaları yapılmıştır.

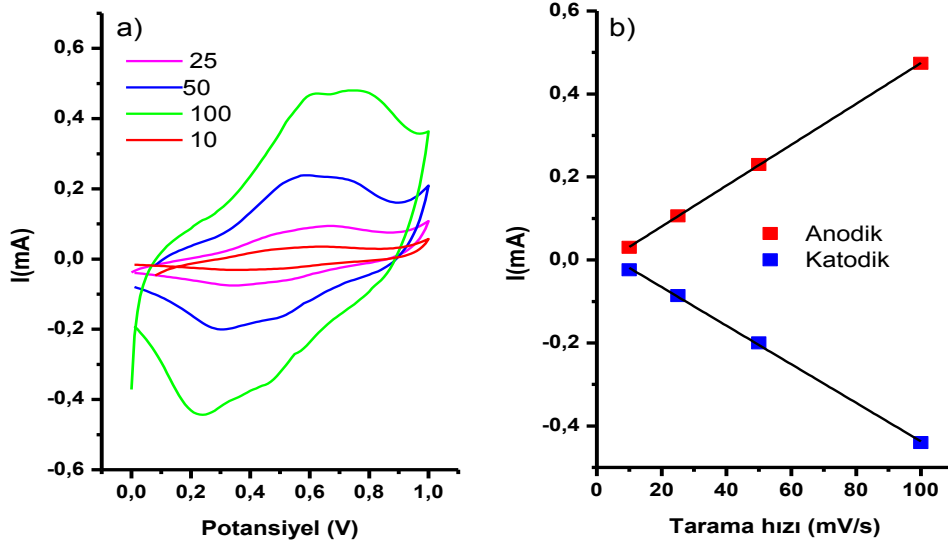
4.6.1. P(SNS-Fc -ko- EDOT) sentezi

Şekil 4.56'da SNS-Fc ve EDOT karışımının ACN/LiClO₄ içerisinde 100 mV/s tarama hızıyla dönüşümlü voltamogramları verilmiştir. Şekilden görüleceği gibi her döngü de akım değerlerinin artması monomerlerin elektrot yüzeyinde polimerleştiğini ve oluşan polimerin iletken olduğunu göstermektedir. Kopolimer dönüşümlü voltamogramının (CV) homopolimer CV'sinden farklı olması kopolimerizasyonun olduğunu göstermektedir. Grubumuzun daha önceki çalışmalarda P(SNS-Fc -ko- EDOT) sentezlenmiş ve optoelektronik özellikleri açısından incelenmiştir.



Şekil 4.56. SNS-Fc ve EDOT monomerlerin ACN/LiClO₄ ortamında, 100 mV/s'deki dönüşümlü voltamogramı

Kopolimerin yükseltgenme ve indirgenme potansiyeli sırası ile 0,77 V ve 0,46 V olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, Fc biriminin yükseltgenme potansiyeli 0,24 V ve indirgenme potansiyeli ise 0,20 V olarak belirlenmiştir (Şekil 4.57a). P(SNS-Fc -ko- EDOT)'in tarama hızı çalışmasına (Şekil 4.57b) anodik ve katodik piklerine bakıldığında, tarama hızındaki artış ile akım yoğunluğunun doğrusal olarak arttığı görülmüştür.



Şekil 4.57. P(SNS-Fc -ko- EDOT)'un ACN/LiClO₄ ortamında, **a)** farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları; **b)** akım-tarama hızı grafiği

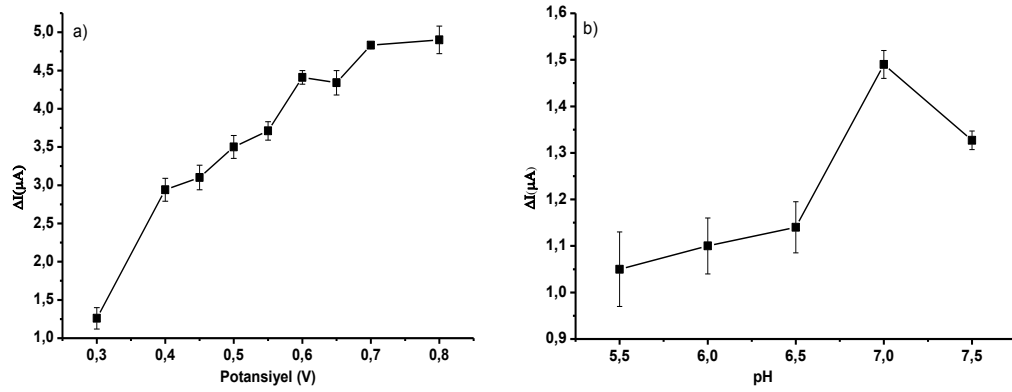
4.6.2. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi

4.6.2.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi

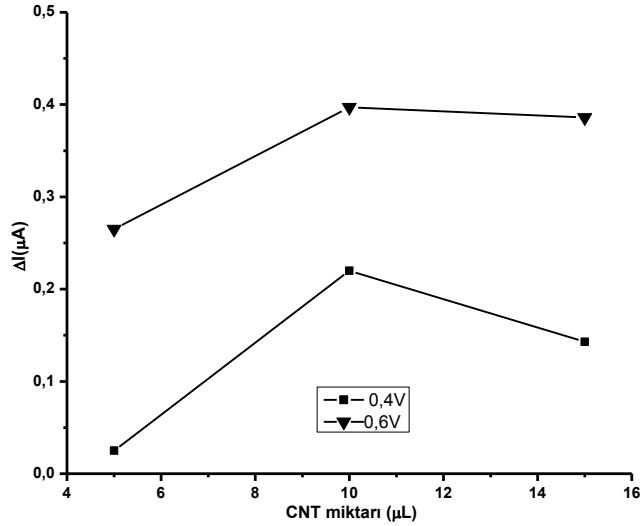
Kopolimer ile hazırlanan biyosensörler için çalışma potansiyeli homopolimerlerde olduğu gibi 0,4 V ve 0,6 V olarak seçilmiştir. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensör aktivitesine ortam pH'nın etkisi araştırmak için çeşitli pH'larda (5,5 – 7,5) 0,1M fosfat tamponları hazırlanmıştır. Sabit 0,5 mM glikoz derişiminde daha önce hazırlanmış değişik pH fosfat tamponunun da 0,4 V sabit potansiyel uygulandığında kararlı halde ki akım değerleri ölçülerek ΔI 'e karşı pH grafiğe geçirilmiştir. Grafikten görüleceği gibi en yüksek değer görüldüğü pH 7,0 uygun çalışma koşulu olarak belirlenmiştir (Şekil 4.58).

4.6.2.2. CNT etkisi

Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensör aktivitesini artırmak için sinyal artırıcı olarak çok duvarlı karbon nanotüp kullanılmıştır. CNT miktarının etkisi araştırmak amacıyla 1 mg CNT/ 1 mL etanol çözeltisinden 5, 10 ve 15 μ L eklemelerle çeşitli elektrotlar hazırlanmıştır. Bu elektrotlar sabit 0,5 mM glikoz derişiminde fosfat tamponunun da 0,4 V ve 0,6 V sabit potansiyel uygulandığında kararlı hal akım değerleri ölçülerek ΔI 'e karşı eklenen CNT miktarı grafiğe geçirilmiştir. Grafikten görüleceği gibi en yüksek değer olan 10 μ L optimum koşul olarak belirlenmiştir (Şekil 4.59).



Şekil 4.58. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün a) akım -potansiyel; b) akım- pH grafikleri (oda koşullarında, 0,5 mM glikoz, 0,1 M fosfat tamponu)



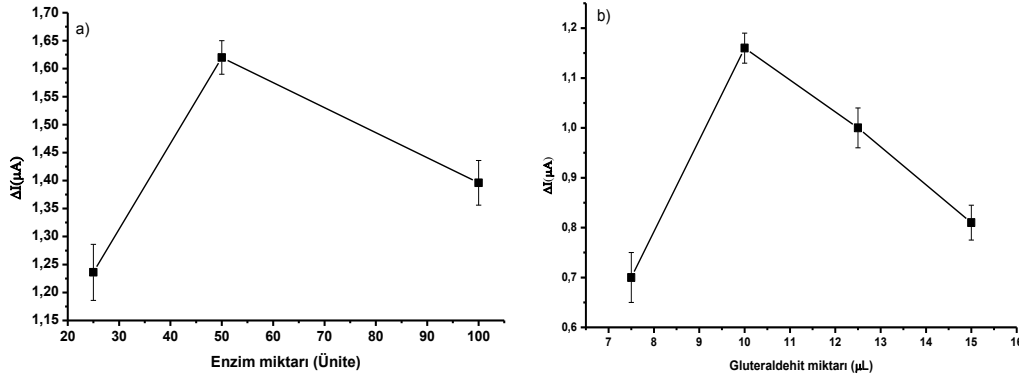
Şekil 4.59. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensöründe CNT miktarının amperometrik cevaba etkisi (oda koşullarında, pH=7,0, 50 U enzim 0,5 mM glikoz, (■)0,4 V ve (▼)0,6 V, 0,1 M fosfat tamponu)

4.6.2.3. Enzim miktarı ve glutraldehit miktarı etkisi

Biyosensör yapımında optimize edilmesi gereken önemli parametrelerden birisi de enzim miktarıdır. Bu sebepten dolayı uygun enzim miktarının belirlemek için diğer tüm etkenler sabit tutularak 25, 50 ve 75 ünite GOX içeren elektrotlar hazırlandı. Şekil 4.60a incelendiğinde 50 U GOX ile hazırlanan elektrodun maksimum akım değişimi gösterdiği tespit edilmiştir.

Glutraldehit etkisini incelemek için tüm diğer etkenler sabit tutulmuş ve % 1 glutraldehit çözeltisinden elektrot yüzeylerine 7,5, 10, 12,5 ve 15 μL damlatılmıştır. Hazırlanan elektrotlar dengeye getirildikten sonra ortamda 0,5 mM glikoz eklenmiş ve kronoamperometrik cevapları kaydedilmiştir. Ölçülen akıma karşı glutraldehit miktarı

grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.60b’de görüleceği gibi optimum gluteraldehit olarak %1’lik çözeltiden 10 μ L bulunmuştur.



Şekil 4.60. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün **a)** akım-enzim miktarı; **b)** akım - gluteraldehit miktarı grafikleri (oda koşullarında, pH=7,0, 10 μ L CNT miktarı, 0,5 mM glikoz, 0,4V, 0,1 M fosfat tamponu)

4.6.3. P(SNS-Fc -ko- EDOT)GOX biyosensörünün 0,6 V’ daki kronoamperometrik bulguları

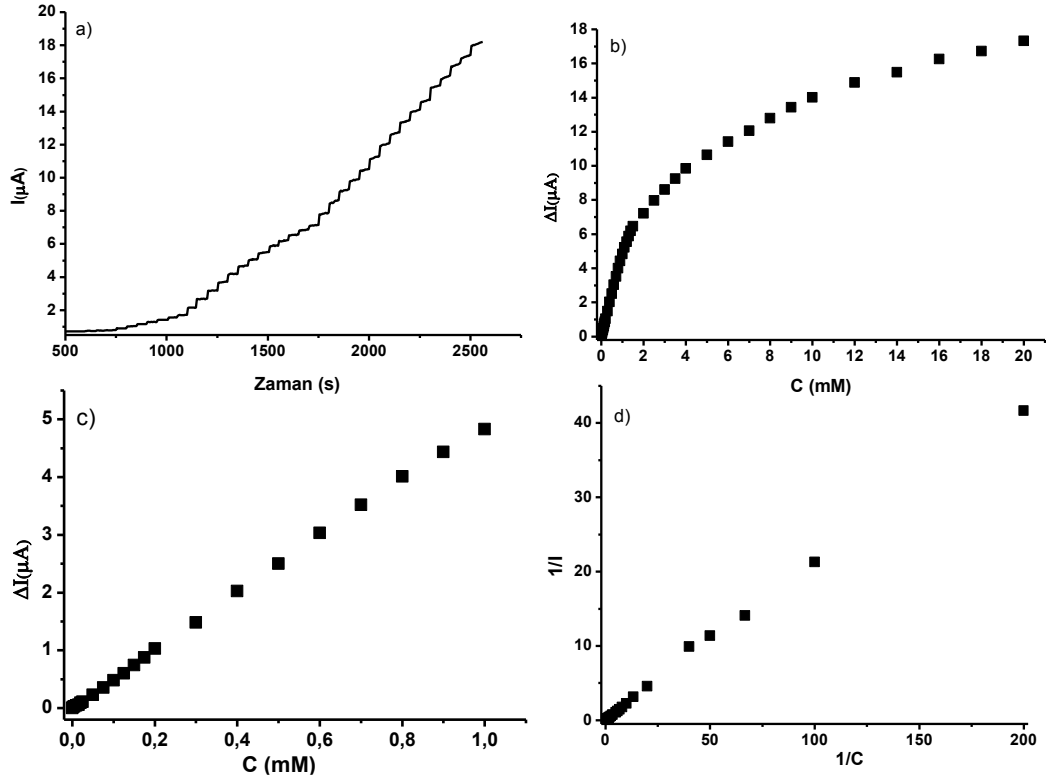
Çalışma elektrodu yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit 0,6 V sabit potansiyelde Ag/AgCl referans elektroduna karşı ölçülmüştür. Şekil 4.61a’da biyosensörün glikoz eklenmesi ile gösterdiği akım değişimi zamana karşı grafiği verilmiştir.

Şekil 4.61c’de Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörün 0,6 V sabit potansiyel için glikoz derişimi artıkça akım değerinin arttığı görülmektedir. Biyosensör kalibrasyonu $y = 4,948x + 0,002$ ($R^2=0,999$) eşitliği ile 0,01 – 1,0 mM arasında doğrusallık göstermektedir. Ayrıca, biyosensör duyarlılığı ve LOD değeri sırası ile 9,43 μ A/(mM.cm²) ve 1,2 μ M olarak bulunmuştur.

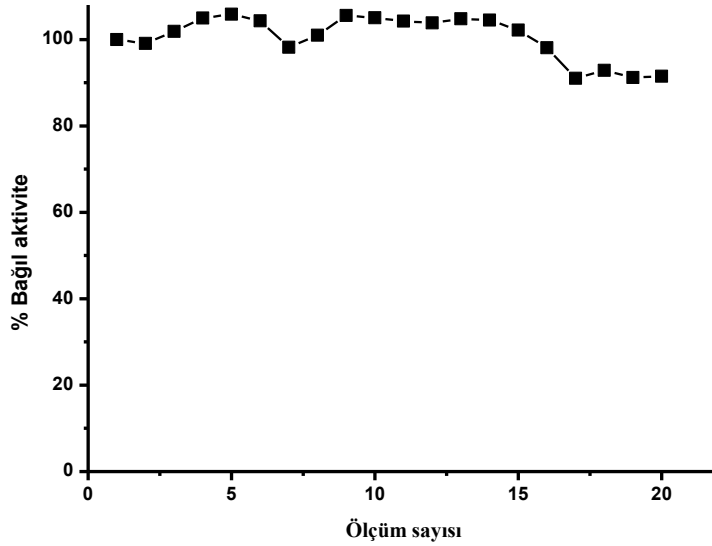
Biyosensörün kinetik parametrelerini belirlenmesi için Lineweaver-Burk(LB) eşitliğe göre 1/S’ye karşılık 1/I grafiği hazırlanmıştır (Şekil 4.61d). Buna göre Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörü LB eşitliği olan $y = 0,210x + 0,128$ ($R^2=0,998$) için K_m ve I_{max} sırasıyla 1,64 mM ve 7,81 μ A olarak bulunmuştur.

4.6.4. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/GOX biyosensörünün 0,6 V’ daki kullanım kararlılığı

Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirlik bakımından değerlendirilmesi 25 °C’de 0,6 V potansiyel uygulanarak bir günde ard arda 20 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Alınan ölçümler sonucunda standart sapma $\pm 0,118$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 5,28 (n=20) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.62’de görüldüğü üzere Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT) /GOX elektrodu yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup 20. kullanımda bile % 92 aktivite göstermektedir.



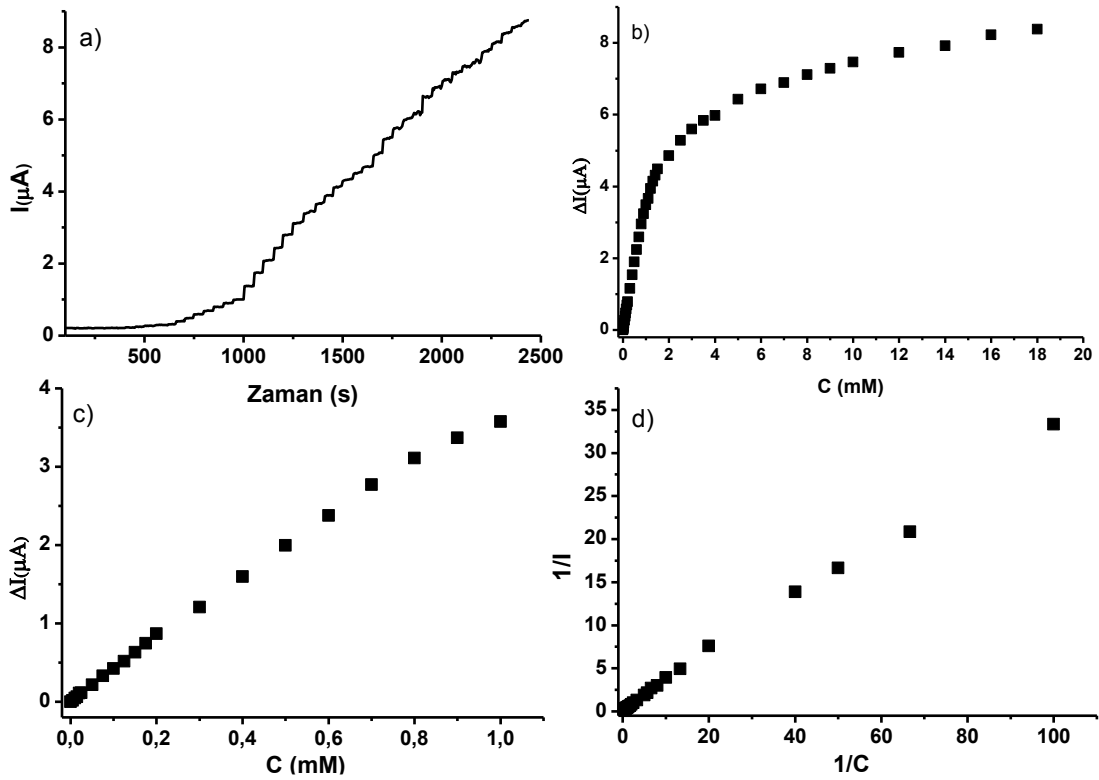
Şekil 4.61. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörünün 0,6 V'daki **a)** akım – zaman; **b)** akım - glikoz derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,6 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)



Şekil 4.62. Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT) /GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,6 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.6.5. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/GOX biyosensörünün 0,4 V’deki kronoamperometrik bulguları

Şekil 4.63a’da glikoz biyosensörün 0,4 V sabit potansiyelde her glikoz eklenmesinden sonraki akım değerlerinin zamana karşı grafiği incelenmiştir. Biyosensör katalitik akımı artan glikoz derişimiyle arttığı gözlenmiştir. Biyosensör için doğrusal aralık 0,01 – 1,0 mM arasında bulunmuşken, duyarlılığı ve LOD değeri sırası ile 7,48 $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ ve 1,1 μM olarak bulunmuştur. Biyosensörün kinetik parametrelerini belirlenmesi için Şekil 4.63d’de Pt/P(SNS-Fc- ko- EDOT)/GOX biyosensörü için K_m ve I_{max} sırasıyla 1,79 mM ve 8,28 μA olarak bulunmuştur.



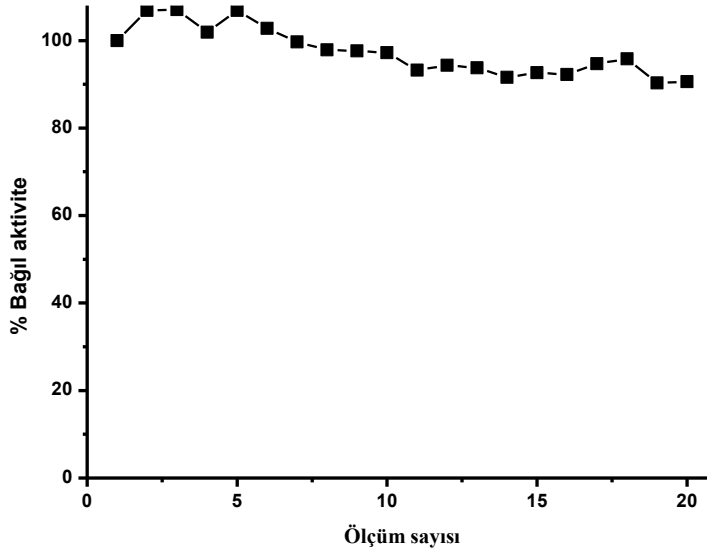
Şekil 4.63. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörünün 0,4 V’deki a) akım – zaman; b) akım - glikoz derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.6.6. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/GOX biyosensörünün 0,4 V’ daki kullanım kararlılığı

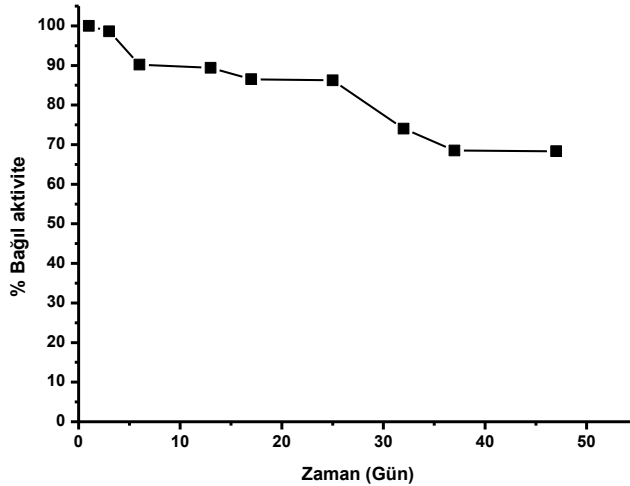
Pt/P(SNS-Fc- ko –EDOT)/GOX biyosensörün tekrar kullanılabilirlik bakımından değerlendirilmesi sonucunda standart sapma $\pm 0,081$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 2,41 ($n=20$) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.64’de görüldüğü üzere Pt/P(SNS-Fc- ko – EDOT)/CNT/GOX elektrodu yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup 20. kullanımda bile % 93 aktivite göstermektedir.

4.6.7. P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki raf ömrü

Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörün raf ömrü tayini için 0,4 V sabit potansiyelde aktiviteler haftada bir kontrol edilmiş ve 47 gün boyunca aktivitelerinin kontrolüne devam edilmiştir. Şekil 4.65 incelendiğinde biyosensörün 6. gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 90 oranında biyosensörün cevap verdiğini ve yedinci hafta (47. gün) sonunda ise % 68 aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.64. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

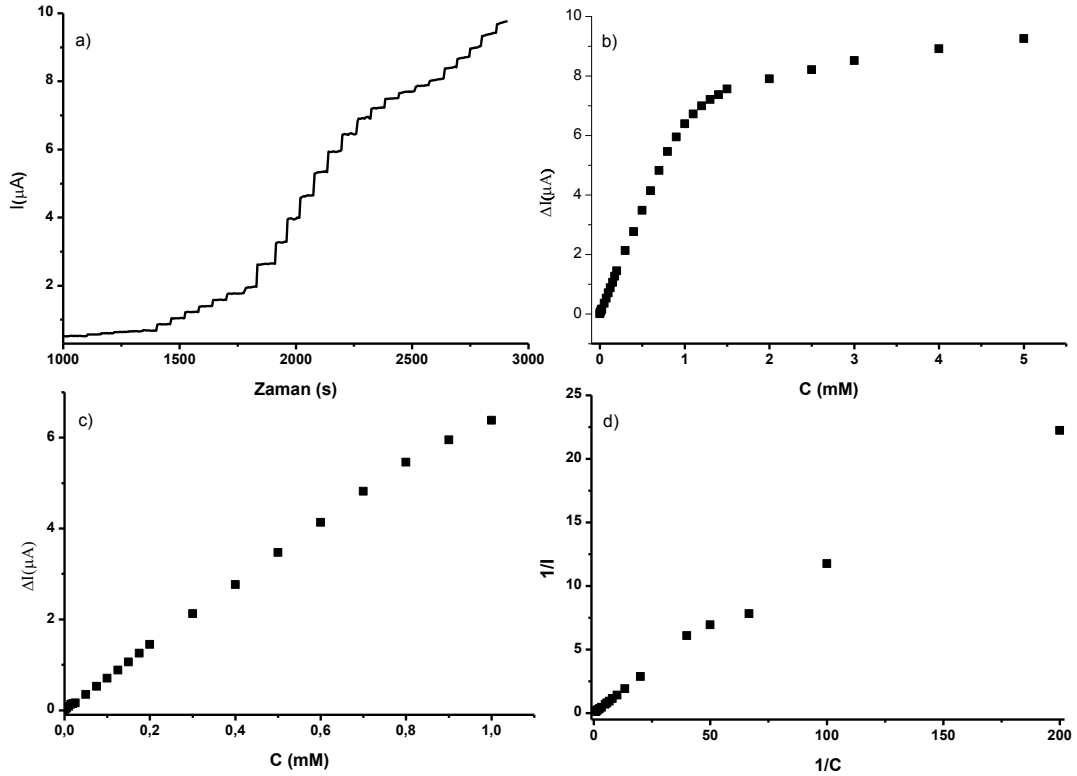


Şekil 4.65. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT) /GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.6.8. P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V’ daki kronoamperometrik bulguları

P(SNS-Fc –ko- EDOT) tabanlı biyosensörlerin analitik performansına CNT’nin etkisini değerlendirilmesi amacı ile Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT hazırlanmış ve aynı koşullar altında incelenmiştir. Çalışma elektrodu yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit 0,6 V sabit potansiyelde Ag/AgCl referans elektroduna karşı ölçülmüştür. Şekil 4.66a’da glikoz biyosensörün 0,6 V sabit potansiyelde her glikoz eklenmesinden sonraki akım değerlerinin zamana karşı grafiği incelenmiştir. Biyosensör için doğrusal aralık 0,01 – 1,0 mM arasında bulunmuştur. Ayrıca, biyosensör duyarlılığı ve LOD değeri sırası ile 13,24 $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ ve 1,7 μM olarak bulunmuştur.

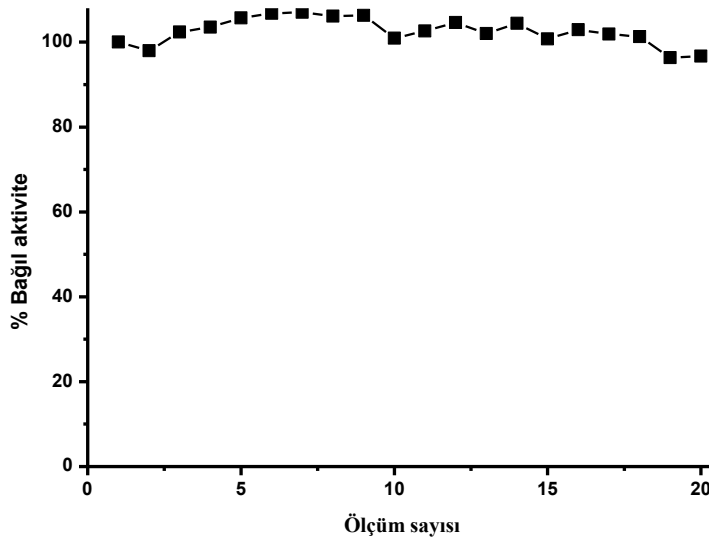
Çalışmanın bir sonraki aşamasında biyosensör kinetik parametrelerini belirlenmesi için Lineweaver-Burk (LB) eşitliğe göre $1/S'$ ’ye karşılık $1/I$ grafiği hazırlanmıştır (Şekil 4.66d). Buna göre Pt/P(SNS-Fc- ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörü için K_m ve I_{max} sırasıyla 0,565 mM ve 4,97 μA olarak bulunmuştur.



Şekil 4.66. Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V’ daki **a)** akım – zaman; **b)** akım - glikoz derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,6 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.6.9. P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,6 V' daki kullanım kararlılığı

Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörün tekrar kullanılabilirlik bakımından değerlendirilmesi 25 °C'de 0,6 V potansiyel uygulanarak bir günde 20 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Alınan ölçümler sonucunda standart sapma $\pm 0,135$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 3,36 (n=20) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.67'de görüldüğü üzere Pt/P(SNS-Fc -ko-EDOT)/CNT/GOX elektrodu yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup 20. kullanımda bile % 96 aktivite göstermektedir.

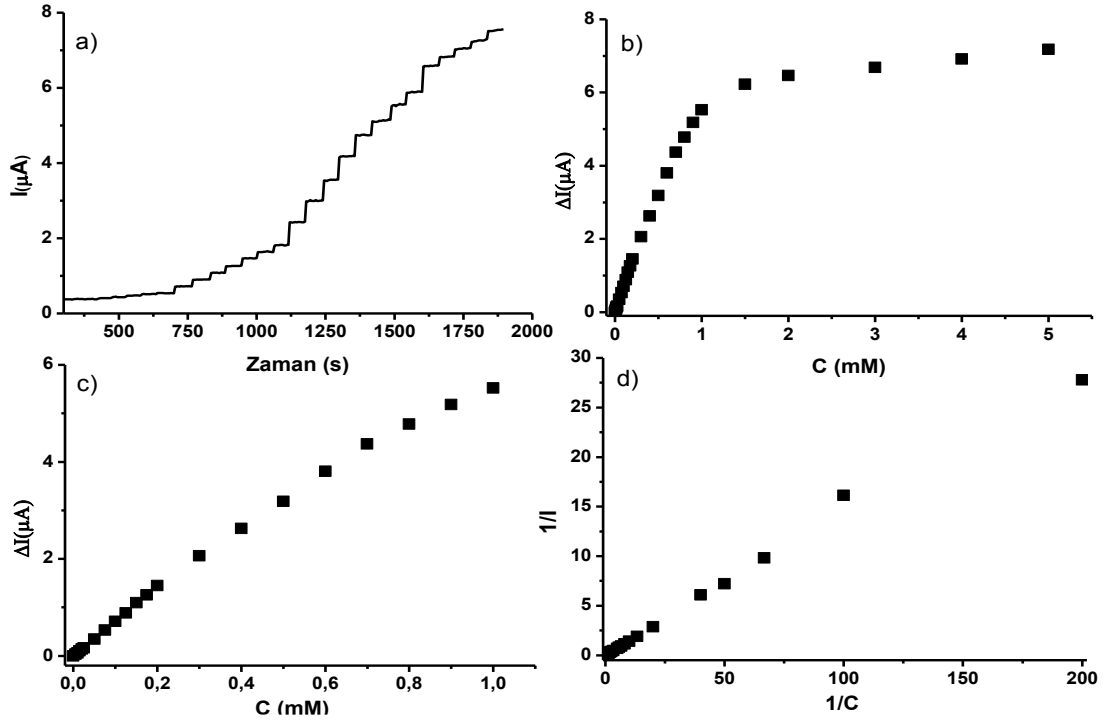


Şekil 4.67. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,6 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.6.10. P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kronoamperometrik bulguları

Şekil 4.68a'da glikoz biyosensörün 0,4 V sabit potansiyelde her glikoz eklenmesinden sonraki akım değerlerinin zamana karşı grafiği verilmiştir. Hazırlanan Pt/PSNS-Fc/CNT/GOX biyosensörü için substrat derişiminin akım yoğunluğuna etkisi incelenmiş ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

Biyosensör kalibrasyonu için doğrusal aralık 0,01 – 1,0 mM arasında bulunmuştur. Ayrıca biyosensör duyarlılığı ve LOD değeri sırası ile 11,58 $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ ve 2,2 μM olarak bulunmuştur. Biyosensör kinetik parametrelerini belirlenmesi için Lineweaver-Burk (LB) eşitliğe göre 1/S'ye karşılık 1/I grafiği hazırlanmıştır (Şekil 4.68d). Buna göre Pt/P(SNS-Fc- ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörü için K_m ve I_{max} sırasıyla 1,43 mM ve 11,38 μA olarak bulunmuştur.



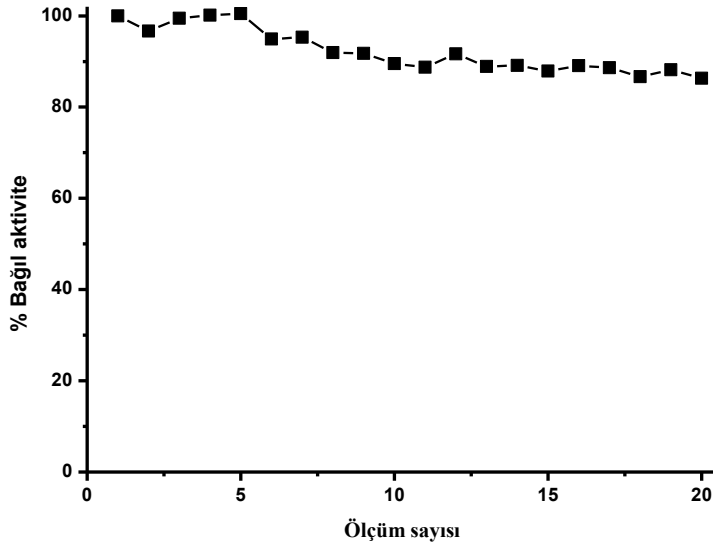
Şekil 4.68. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V'daki **a)** akım – zaman; **b)** akım değişim - glikoz derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.6.11. P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki kullanım kararlılığı

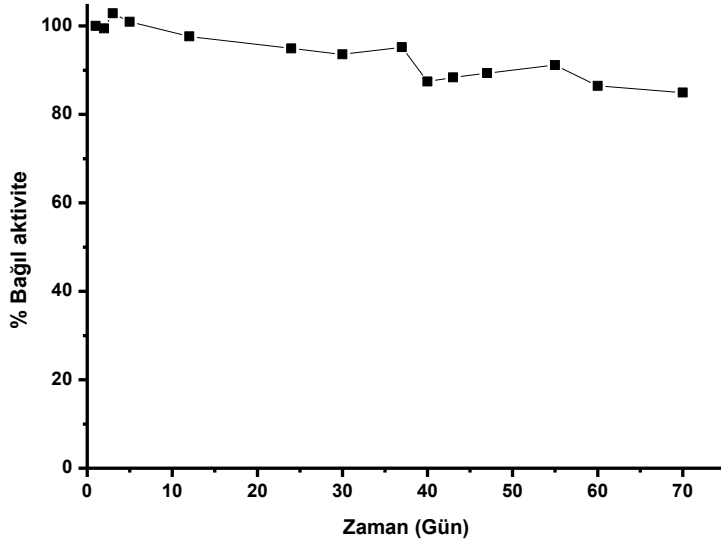
Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörün tekrar kullanılabilirlik bakımından değerlendirilmesi 25 °C'de 0,4 V potansiyel uygulanarak bir günde 20 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Alınan ölçümler sonucunda standart sapma $\pm 0,15$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 5,16 (n=20) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.69'da görüldüğü üzere Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX elektrodu yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup 20. kullanımda bile % 86 aktivite göstermektedir.

4.6.12. P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün 0,4 V' daki raf ömrü

Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensör için 70 gün boyunca düzenli olarak haftada bir yapılan ölçümler sonucunda Şekil 4.70 çizilmiştir. Raf ömrü olarak ilk 37 gün sonunda % 95 aktivite gösterirken 70. gün sonunda % 84 aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



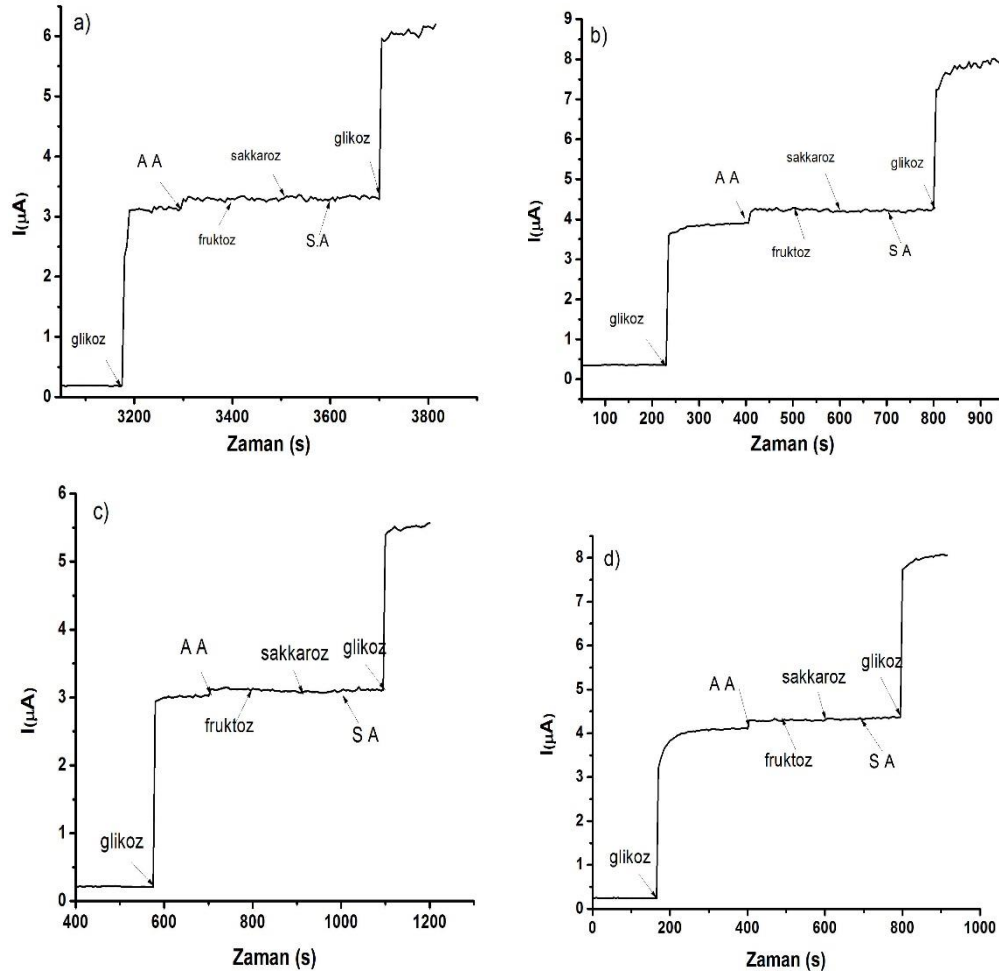
Şekil 4.69. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)



Şekil 4.70. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün raf ömrü grafiği (0,4 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

4.6.13. Girişim etkisi ile ilgili bulgular

Girişim etkisini belirlemek için, 0,1 mM – 0,5 mM derişim aralığında askorbik asit, sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit gibi ticari ürünlerde bulunan katkı maddelerinin etkileri çalışılmıştır. P(SNS-Fc -ko- EDOT) kopolimer ile yapılan elektrotlar için amperometrik ölçümler sırasında glikoz yerine bu tür maddeler çalışma hücrelerine eklemeler yapılmıştır.



Şekil 4.71. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX biyosensörünün **a)** 0,4 V; **b)** 0,6 V ve Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörünün **c)** 0,4 V; **d)** 0,6 V askorbik asit, sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit girişim etkisi

P(SNS-Fc -ko- EDOT) CNT kullanılmadan hazırlanan biyosensörlerde askorbik asit etkisi 0,4 V'da % 3,4 ve 0,6 V için % 8,7 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, P(SNS-Fc -ko- EDOT) ve CNT içeren biyosensörlerde ise 0,4 V'da %3,1 ve 0,6 V için % 6,4 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.71).

P(SNS-Fc -ko- EDOT) kopolimeri ile yapılan biyosensörler önceki bölümde P(SNS-Fc) homopolimeri ile yapılan elektrotlar gibi, hidrojenperoksit takibi yapılan çalışmalarda askorbik aside tepki verdiği belirlenmiştir. Sakkaroz, fruktoz ve sitrik asit ise cevap alınmamıştır. Ancak, meyve sularında bulunan askorbik asitin glikoza oranla çok az olduğundan bu etkinin ihmal edilebilecek düzeyde olduğu düşünülmüştür. Biyosensörün 0,4 V'da yapılan çalışmalarında başka maddeler varlığında bile glikoza karşı seçici davrandığı tespit edilmiştir.

4.6.14. Gerçek numune analizi ile ilgili bulgular

Meyve sularında yapılan glikoz analizi sonunda ölçülen amperometrik cevap akımlarına denk gelen derişim değerleri kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır. Tasarlanan biyosensörler ile Cappy vişne, Cappy karışık ve Tamek % 100 elma suyu ticari meyve sularında glikoz tayini yapılmış ve 0,4 V’da referans metot ile tutarlı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. P(SNS-Fc -ko- EDOT) ile hazırlanan biyosensörlerle içeceklerde glikoz tayini

Örnek	Vişne suyu (mg/L)	GK	Elma suyu (mg/L)	GK	Karışık meyve suyu (mg/L)	GK
HPLC	43,2 ±0,12		15,72		32,3 ±0,03	
Pt/P(SNS-Fc-ko-EDOT)/CNT/GOX 0,6V	51,7 ±0,52	119,4	23,2± 1,4	147,6	36,3 ±1,1	112,4
Pt/P(SNS-Fc-ko-EDOT)/CNT/GOX 0,4V	42,63 ±0,25	98,7	16,18± 0,32	102,9	30,9 ±0,8	95,7
Pt/P(SNS-Fc-ko-EDOT) GOX 0,6V	47,06 ±0,31	108,9	21,25± 1,6	135,2	39,8 ±1,95	123,2
Pt/P(SNS-Fc-ko-EDOT) GOX 0,4V	42,68 ±0,67	98,8	16,13± 0,73	102,6	30,92 ±1,27	95,8

GK: Geri Kazanım

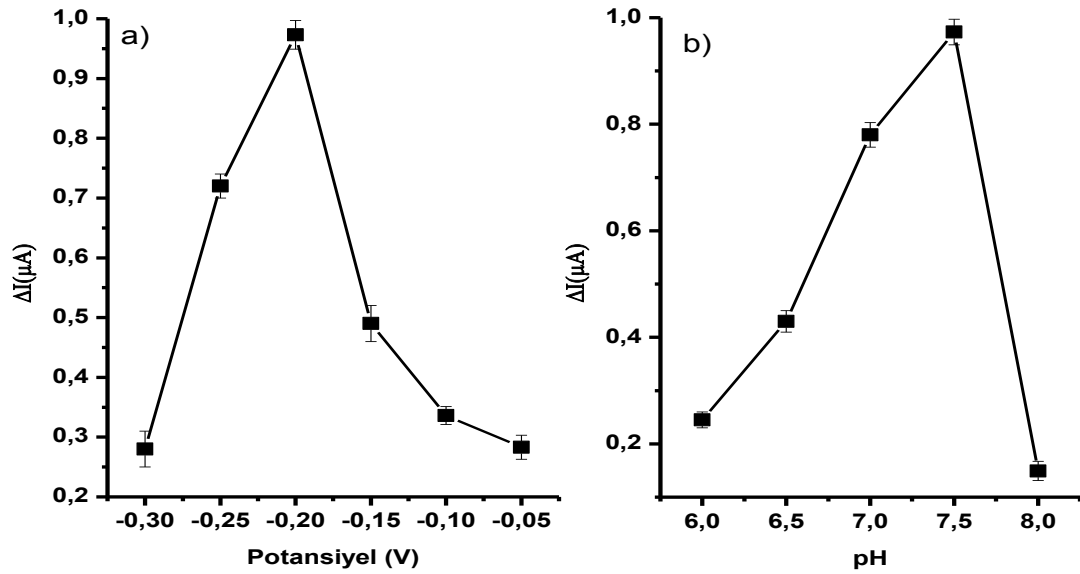
4.7. P(SNS-Fc -ko- EDOT) Tabanlı Üre Biyosensörleri ile ilgili Bulgular

4.7.1. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi

4.7.1.1. Potansiyel ve pH çalışması

Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörü için -0,3 ile 0,0 V aralığında potansiyel çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada 0,25 mM üre varlığında ölçülen akımlar kaydedilmiş olup potansiyele karşı ΔI grafiği çizilmiştir. Şekil 4.72a'da görüldüğü gibi maksimum akım değişiminin görüldüğü nokta optimum potansiyel olan -0,2 V olarak belirlenmiştir.

Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörü için pH 6,0 ile 8,0 aralığındaki 0,25 mM üre varlığında ölçülen akımlar kaydedilmiştir. pH'e karşı ΔI değerleri ile grafik çizilmiş ve Şekil 4.72b'de görüldüğü gibi maksimum akım değişiminin görüldüğü nokta olan pH=7,5 optimum olarak belirlenmiştir.

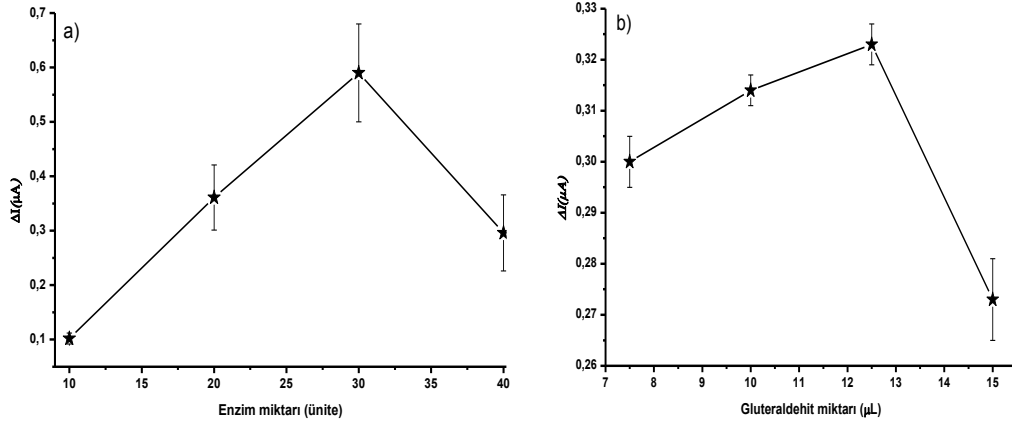


Şekil 4.72. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörünün a) akım – potansiyel; b) akım – pH grafikleri (0,10 M fosfat tamponu, -0,20 V, oda sıcaklığı)

4.7.1.2. Enzim miktarı ve glutraldehit miktarı etkisi

Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörünün analitik performansına enzim miktarının etkisini incelemek amacı ile 10, 20, 30 ve 40 ünite enzim yüklenmiş elektrotlar hazırlanmıştır. Bu elektrotların her birinin 0,2 mM üreye karşı göstermiş olduğu akım değişimleri kayıt edilmiş ve enzim miktarına karşı ΔI değerleri ile grafik çizilmiştir. Şekil 4.73a'da görüldüğü gibi maksimum akım değişiminin görüldüğü nokta olan bulunan 30 U optimum olarak belirlenmiştir.

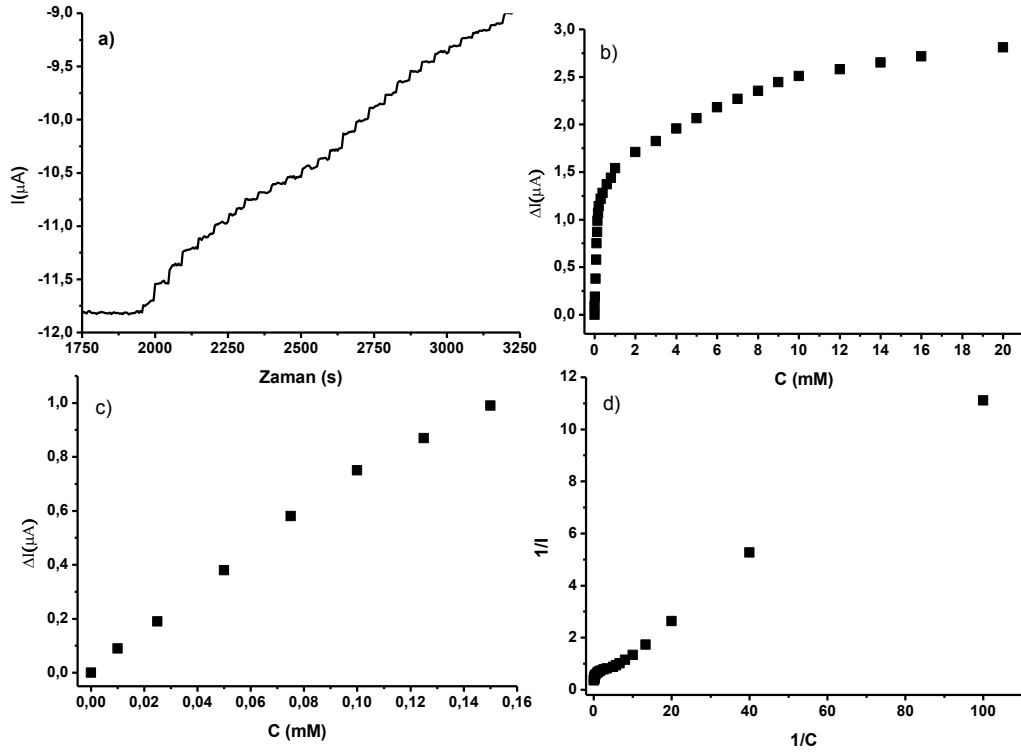
Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörü için glüteraldehit etkisini incelemek için diğer tüm etkenler sabit tutularak ve % 1 glüteraldehit çözeltisinden elektrotların yüzeyine 7,5, 10, 12,5 ve 15 μL damlatılmıştır. Hazırlanan elektrotlar dengeye getirildikten sonra ortama 0,2 mM üre eklenmiş ve ölçülen kronoamperometrik cevapları kaydedilmiştir. Glüteraldehit miktarına karşı ΔI değerleri ile grafik çizilmiştir. Şekil 4.73'de görüldüğü gibi tepe nokta olarak gözlemlenen 12,5 μL optimum olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.73. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörünün **a)** akım-enzim miktarı; **b)** akım-glüteraldehit miktarı grafikleri (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, -0,20 V, oda sıcaklığı)

4.7.2. Kronoamperometrik bulguları

Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörünün kronoamperometrik çalışmaları için daha önce belirlenen optimum koşullardaki reaksiyon hücresine belli miktarlarda üre eklenmiştir (Şekil 4.74). Bu biyosensör için 0,01-0,15 mM ($y= 6,743x + 0,03$) doğrusal aralık ve 13,49 $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ duyarlılık bulunmuş ve LOD değeri 1,9 μM olarak hesaplanmıştır. LB grafiği ($y=0,108x + 0,428$) çizilmiş ve K_m ve I_{max} değerleri sırasıyla 0,252 mM ve 2,34 μA olarak hesaplanmıştır.



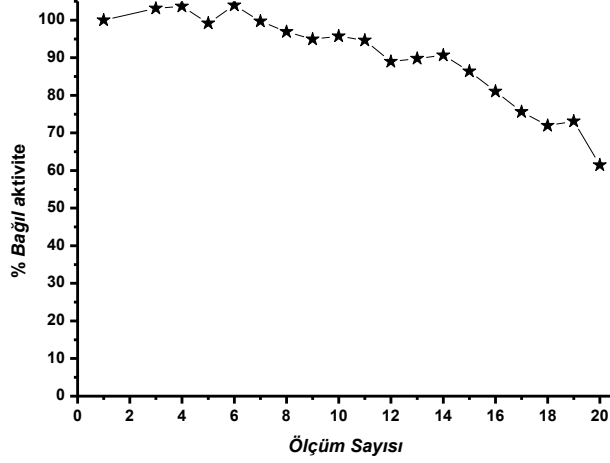
Şekil 4.74. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörünün **a)** akım – zaman; **b)** akım - üre derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, -0,20 V, oda sıcaklığı)

4.7.3. Biyosensörün kullanım kararlılığı

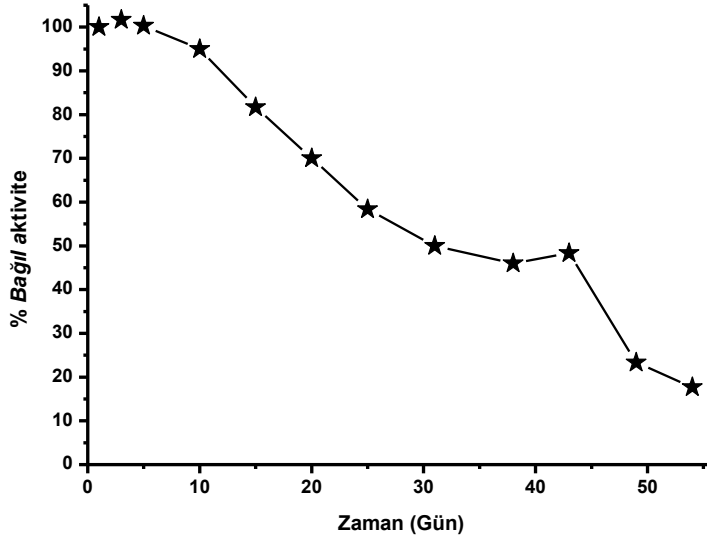
Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörün tekrar kullanılabilirlik bakımından değerlendirilmesi oda sıcaklığında bir günde ard arda 20 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Çalışma sonucunda standart sapma $\pm 0,095$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 2,67 (n=8) olarak hesaplanmış ve elektrodun 8. ölçüm sonunda % 96 aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Daha fazla kullanımda ise aktivitede azalma yaşandığı belirlenmiş ve biyosensörün 20. kullanımda % 61 aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.75).

4.7.4. Biyosensörün raf ömrü

Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörü için daha önce belirlenen optimum koşullarda 54 gün boyunca haftada bir 0,15 mM üre ile ölçüm alınmıştır. Ölçümlerden elde edilen akım değişimleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.76'da görüleceği gibi üre biyosensöründe ilk 10 günden sonra çok hızlı olarak aktivite kaybı yaşandığı görülmektedir. Raf ömrü çalışmasında 10 gün sonunda %95 aktivite olmasına rağmen 54. günde % 20 aktivite görülmüştür. Bu sonuçlar üre biyosensörün 10 günlük raf ömrü olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.75. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, -0,20 V, oda sıcaklığı)

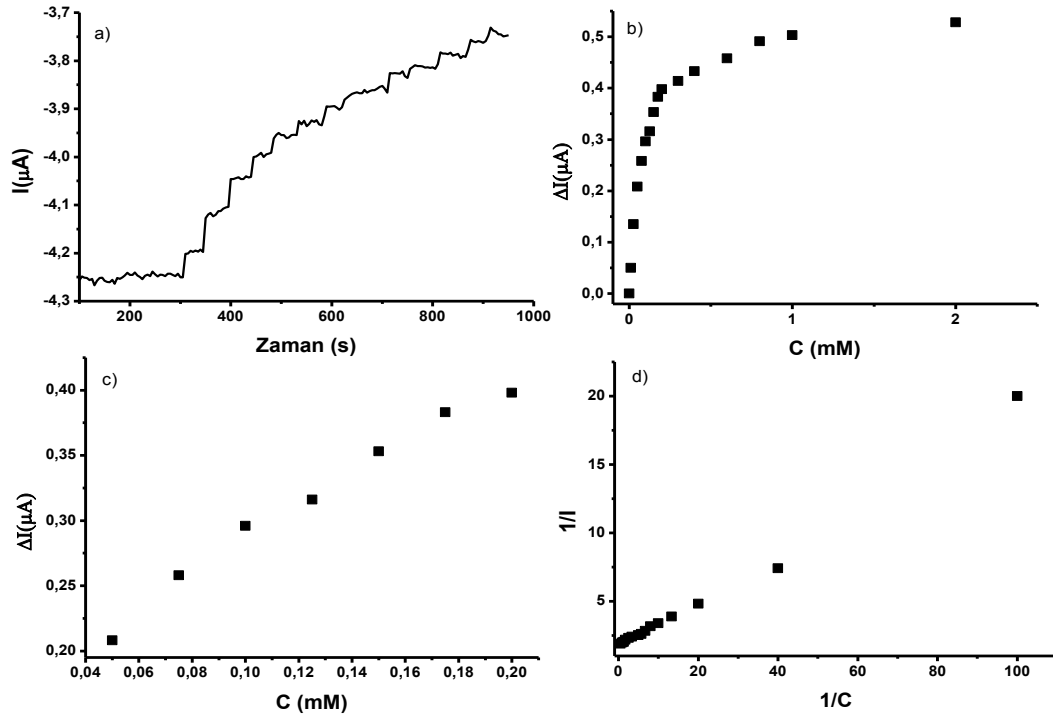


Şekil 4.76. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensör raf ömrü grafiği (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, -0,20 V, oda sıcaklığı)

4.8. P(SNS-Fc) Tabanlı Üre Biyosensörleri ile ilgili Bulgular

4.8.1. Kronoamperometrik bulgular

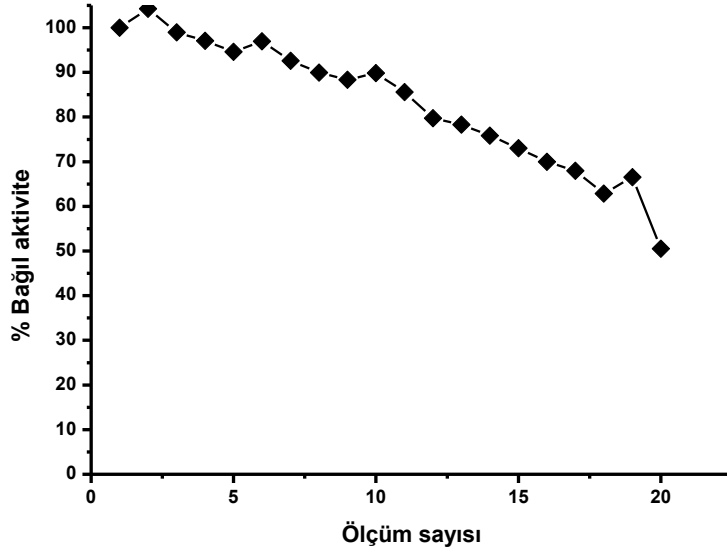
Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz biyosensörün kronoamperometrik çalışmaları kopolimer içeren biyosensör için bulunan optimum koşullarda reaksiyon hücresine belli miktarlarda üre eklemesi ile kayıt edilmiştir (Şekil 4.77). Bu biyosensör için 0,05-0,2 mM ($y= 1,25x + 0,15$) doğrusal aralık ve $2,5 \mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ duyarlılık bulunmuş ve LOD değeri $52,8 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. LB grafiği ($y=0,177x + 1,634$) çizilmiş ve K_m ve I_{max} değerleri sırasıyla $0,1 \text{ mM}$ ve $0,612 \mu\text{A}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.77. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz biyosensörünün a) akım – zaman; b) akım - üre derişimi; c) kalibrasyon; d) Lineweaver-Burk grafikleri (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, $-0,20 \text{ V}$, oda sıcaklığı)

4.8.2. Kullanım kararlılığı

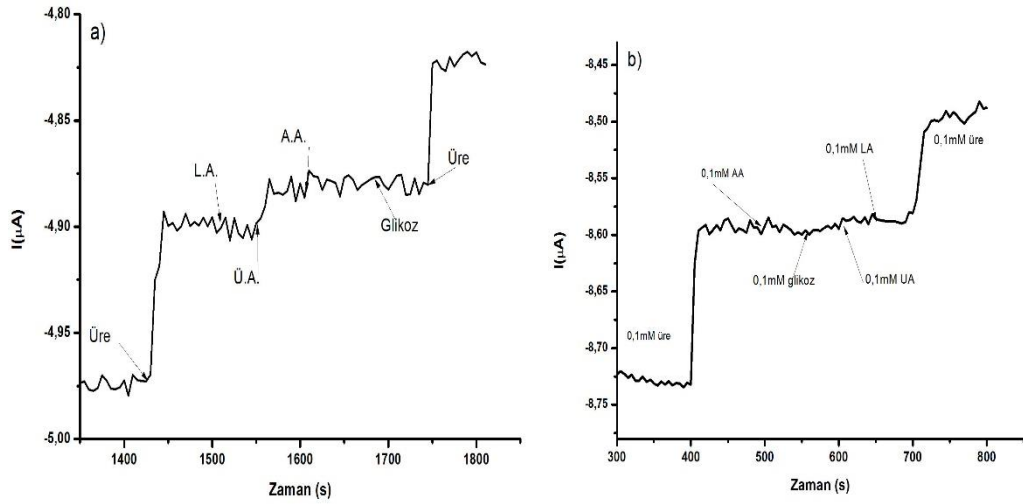
Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğinin değerlendirilmesinde üçüncü ölçümden itibaren aktivite kaybının başladığı ve altıncı ölçüm sonunda S.D. $0,032$ ve cv ise $3,36$ olduğu belirlenmiştir. Bu biyosensör için 20. ölçüm sonunda % 50 aktivite kaybı olduğu görülmüştür. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz biyosensörü için ard arda 6 kullanımın uygun olduğu düşünülmüştür (Şekil 4.78).



Şekil 4.78. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz biyosensörünün ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, -0,20 V, oda sıcaklığı)

4.8.3. Girişim etkisi ile ilgili bulgular

Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz ve Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörleri için gerçek numune analizinde ortamda bulunabilecek bazı maddelerin (glikoz, ürik asit, askorbik asit ve laktik asit) girişim etkisi incelenmiştir (Şekil 4.79). Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz biyosensörüne glikoz ve laktik asit girişim yapmazken, askorbik asit % 8,1 ve ürik asit %16,2 oranında etki yapmıştır. Bu durum gerçek numune analizinde % 25,98'lik hata olmasına sebep olmuştur (Çizelge 4.6). Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensöründe yine glikoz ve laktik asit etkisi olmamasına rağmen askorbik asit % 1,4 ve ürik asit % 6,4 oranında etki yapmıştır. İdrarda yapılan ölçümlerde % 104 geri kazanım ile sonuç alınmıştır. Çizelge 4.6'da görüleceği gibi kopolimer ile yapılan üre biyosensörünün homopolimer ile yapılan biyosensöre göre daha yüksek doğrulukta olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.79. a) Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz; **b)** Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörlerinin askorbik asit, glikoz, ürik asit ve laktik asit ile girişim etkisi

4.8.4. Gerçek numune analizi ile bulgular

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkezi Laboratuvarından alınan idrar numunesi ile yapılan analizler sonucunda ölçülen amperometrik cevap akımlarına denk gelen derişim değerleri kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır. Tasarlanan biyosensörler ile idrardaki üre tayini -0,2 V potansiyelde yapılmış ve Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/Üreaz enzim sensörü ile referans metod (Siemens marka Advia 2400 model) ile tutarlı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.6) Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz biyosensör ise girişim etkisi bölümünde anlatıldığı gibi askorbik asite karşı yüksek duyarlılığından dolayı referans metordan sapma göstermiştir.

Çizelge 4.6. Üre biyosensörlerinin gerçek numune analizleri

Örnek	Spektroskopik (UV)	Pt/P(SNS-Fc–ko-EDOT) /CNT/Üreaz	Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz
İdrar	8,997±0,09	9,362±0,38	11,334±0,32
Geri Kazanım		% 104,0	% 125,98

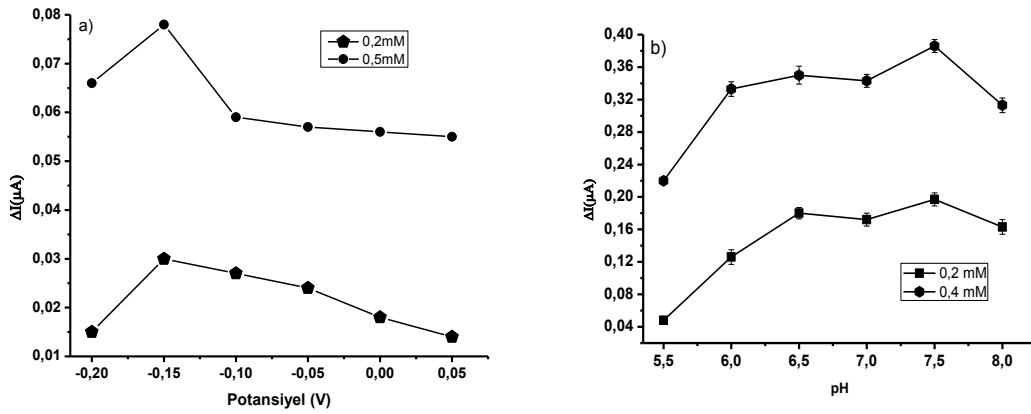
4.9. P(SNS-Fc) Tabanlı Polifenol Biyosensörleri ile ilgili Bulgular

Optimum çalışma koşullarını belirlemek üzere çalışma potansiyel, pH, enzim miktarı ve glutraltehit miktarı etkisi incelenmiştir. Karbon nanotüp ise önceki çalışmalar baz alınarak 1 mg/mL CNT/etanol çözeltisinde 10 µL elektrot yüzeyine damlatılarak kullanılmıştır.

4.9.1. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi

4.9.1.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi

P(SNS-Fc)/CNT/PPO ile yapılan çalışmalar için substrat olarak katekol kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında -0,2 ile 0,05 V arasındaki potansiyeller için incelenmiş ve Şekil 4.80a'da görüleceği gibi maksimum nokta olan -0,15 V optimum çalışma potansiyeli olarak belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. Daha sonra biyosensörün 5,5 ile 8,0 pH aralığında 0,2 ve 0,4 mM katekole karşı gösterdiği amperometrik sinyaller incelenmiştir. Şekil 4.80b' de görüldüğü üzere her iki derişim için de pH 7,5'da en yüksek akım artışı görülmüştür.

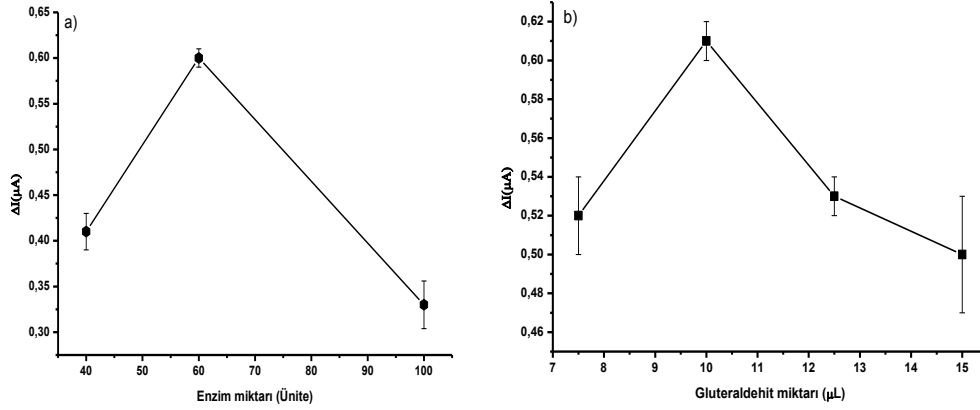


Şekil 4.80. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO biyosensörünün a) akım-potansiyel (■)0,2mM ve (●)0,5mM; b) akım - pH grafiği (■)0,2mM ve (●)0,4mM grafikleri (0,10 M fosfat tamponu, -0,15 V, oda sıcaklığı)

4.9.1.2. Enzim ve glutraldehit etkisi

Enzim miktarının biyosensörün analitik performansına etkisini incelemek için P(SNS-Fc)/CNT içeren elektrotlara 40, 60 ve 100 ünite PPO immobilize edilmiştir. Bu elektrotlarla substrat olarak 0,5 mM katekol varlığında alınan cevaplar Şekil 4.81a'daki gibi grafiğe geçirilmiştir. Optimum enzim miktarı 60 ünite olarak belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

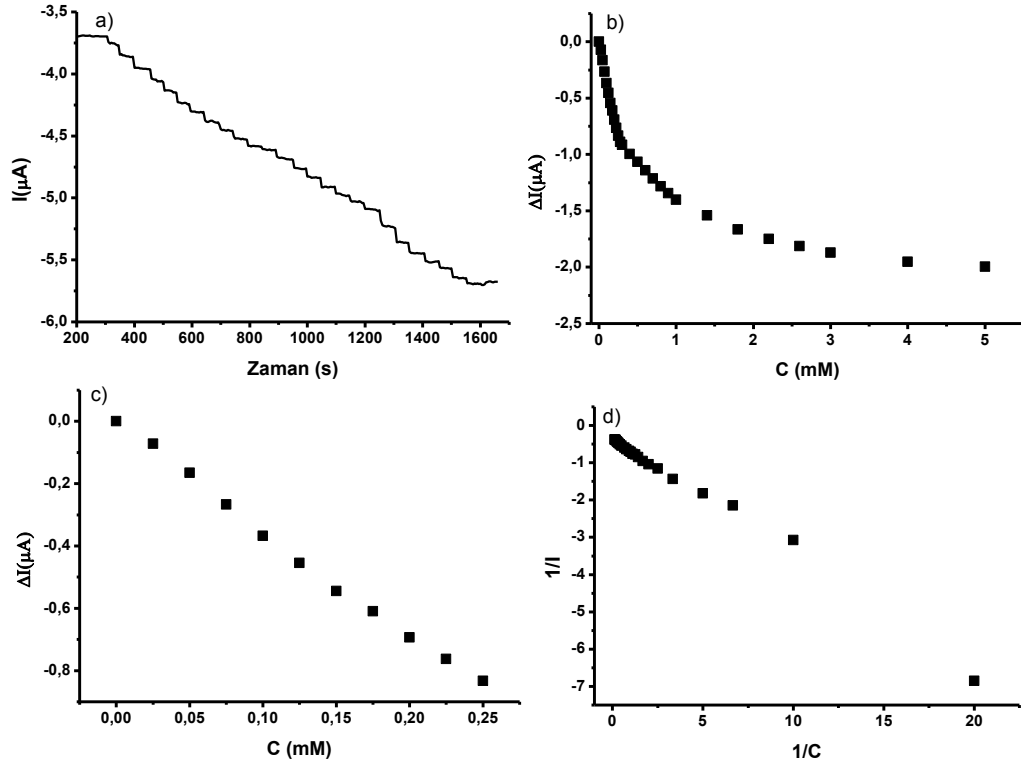
Biyosensör için çapraz bağlayıcı miktarının etkisini incelemek üzere % 1'lik glutraldehit çözeltisinden 7,5, 10, 12,5 ve 15 μL elektrot yüzeyine damlatılmıştır. Elektrotların 0,5 mM katekole verdiği cevaplar Şekil 4.81b'de gösterildiği gibi grafiğe geçirilmiş ve optimum olarak 10 μL glutraldehit miktarı belirlenmiştir.



Şekil 4.81. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO biyosensörünün **a)** akım -enzim miktarı; **b)** akım - glutraldehit miktarı grafikleri (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, -0,15 V, oda sıcaklığı)

4.9.2. Kronoamperometrik bulgular

Hazırlanan biyosensörün -0,15 V sabit çalışma potansiyelinde değişen substrat derişimine bağlı akım grafikleri ve ilgili kalibrasyon eğrileri Şekil 4.82'de gösterilmiştir. Biyosensörün katekole karşı $y = -3,41x - 0,007$ ($R^2=0,996$) denklemine göre değiştiği ve biyosensörün doğrusal aralığının 0,02 – 0,25 mM arasında olduğu bulunmuştur. Biyosensörün duyarlılığı ve LOD değerleri sırası ile 6,82 $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ ve 3,9 μM olarak tespit edilmiştir. Biyosensörün kinetik parametrelerini belirlenmesi için Lineweaver-Burk(LB) eşitliğe göre $1/C$ 'ye karşılık $1/I$ grafiği hazırlanmıştır (Şekil 4.82d). Buna göre Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO biyosensörü için $y = -0,311x - 0,356$ ($R^2=0,992$) denkleminde K_m ve I_{max} sırasıyla 0,874 mM ve 2,81 μA olarak bulunmuştur.



Şekil 4.82. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO biyosensörünün **a)** akım – zaman; **b)** akım - katekol derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, -0,15 V, oda sıcaklığı)

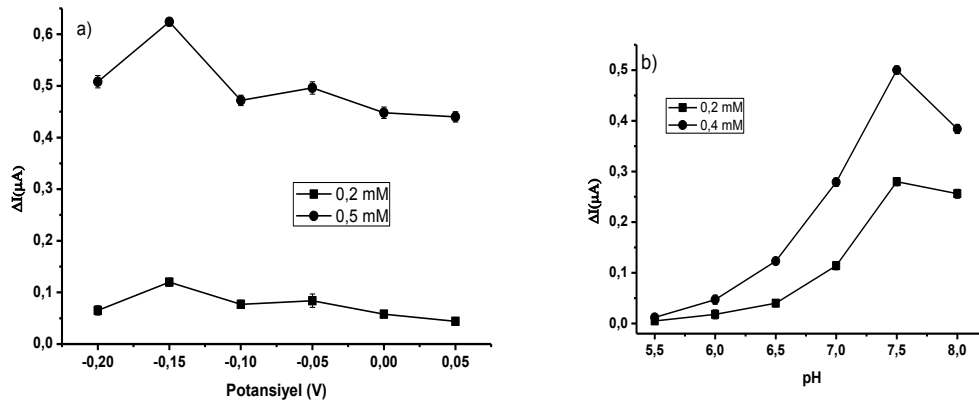
4.10. P(SNS-Fc -ko- EDOT) Tabanlı Polifenol Biyosensörü ile ilgili bulgular

Kopolimer tabanlı PPO biyosensörlerinin analitik performanslarını incelemek üzere P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/PPO elektrodu hazırlanmıştır. Bu noktada öncelikle çalışma potansiyeli, pH, enzim ve gluteraldehit miktarının etkileri incelenmiştir. Daha önceki çalışmalar dikkate alınarak CNT 1 mg/mL CNT/Etanol çözeltisinde 10 µL elektrot yüzeyine damlatılarak gerçekleştirilmiştir.

4.10.1. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi

4.10.1.1. Çalışma potansiyeli ve pH etkisi

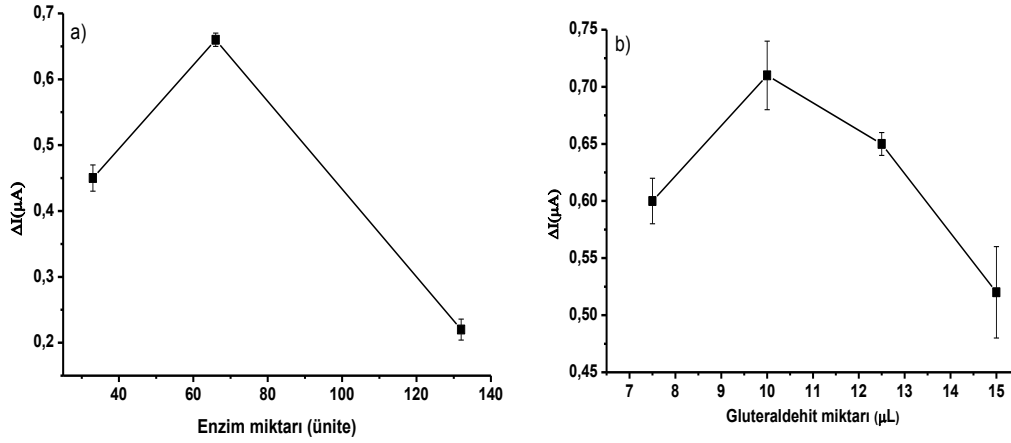
P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/PPO ile yapılan çalışmalar için substrat olarak katekol kullanılmıştır. Uygun çalışma potansiyelinin belirlenmesi için -0,2 ile 0,05 V arasında çalışılmıştır. Şekil 4.83a'da görüleceği gibi tepe nokta olan -0,15 V optimum potansiyel olarak belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. Daha sonra biyosensörün 5,5 ile 8,0 pH aralığında 0,2 ve 0,4 mM katekole karşı gösterdiği amperometrik tepkiler incelenmiştir. Şekil 4.83b'de görüldüğü üzere her iki derişim içinde pH 7,5'da en yüksek akım artışı göstermiştir.



Şekil 4.83. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/PPO biyosensörünün **a)** akım-potansiyel (■)0,2mM ve (●)0,5mM; **b)** akım - pH grafiği (■)0,2mM ve (●)0,4mM (0,10 M fosfat tamponu, -0,15 V, oda sıcaklığı)

4.10.1.2. Enzim ve gluteraldehit etkisi

P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/PPO ile enzim miktarı çalışması için elektrotlara 30, 60 ve 120 ünite PPO enzimi immobilize edilmiştir. Bu elektrotlarla substrat olarak 0,5 mM katekol varlığında alınan cevaplar Şekil 4.84a'daki gibi grafiğe geçirilmiştir. Optimum enzim miktarı 60 ünite olarak belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.



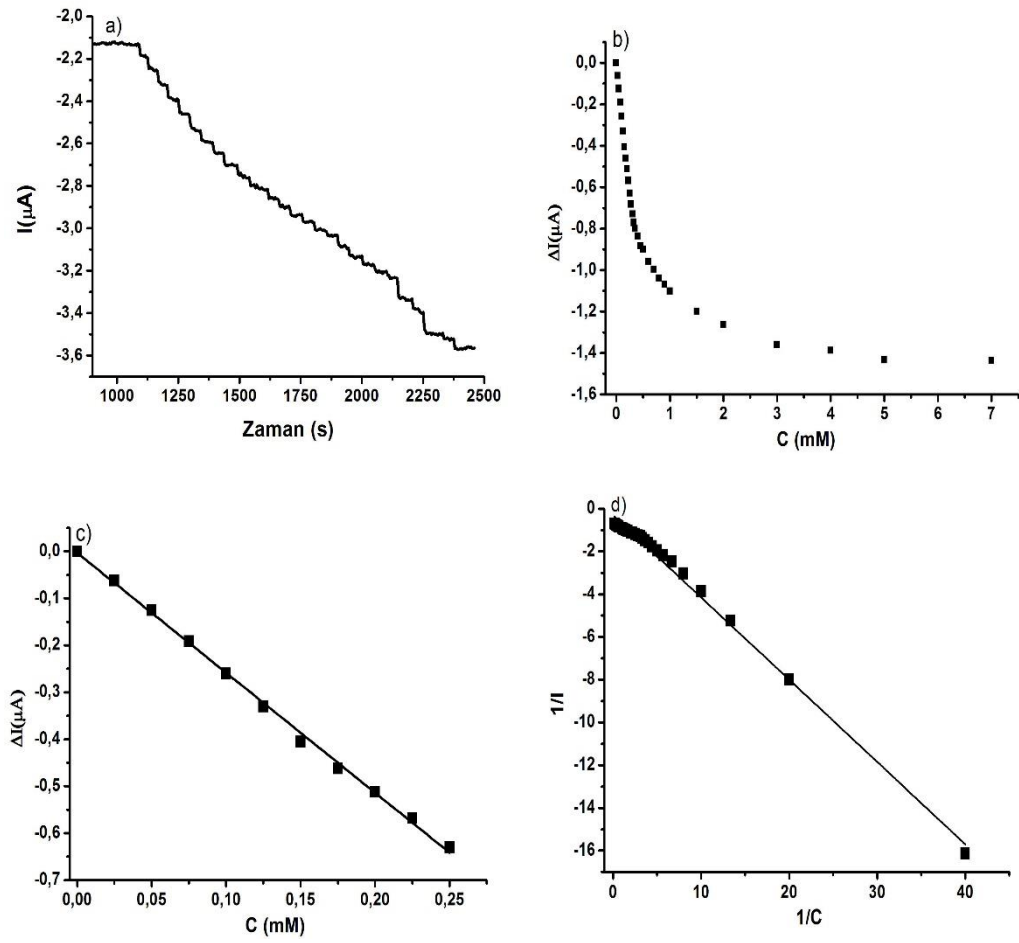
Şekil 4.84. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/PPO biyosensörünün **a)** akım-enzim miktarı; **b)** akım - gluteraldehit miktarı grafikleri (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, -0,15 V, oda sıcaklığı)

Çapraz bağlayıcı etkisini incelemek için % 1'lik gluteraldehit çözeltisinden 7,5, 10, 12,5 ve 15 μL elektrot yüzeyine damlatılmıştır. Söz konusu elektrotların 0,5 mM katekol varlığındaki cevapları Şekil 4.84b'de gösterildiği gibi grafiğe geçirilmiş ve 10 μL gluteraldehit optimum koşul olarak belirlenmiştir.

4.10.2. Kronoamperometrik bulgular

Hazırlanan Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/PPO biyosensörünün -0,15 V sabit çalışma potansiyelinde değişen substrat derişimine bağlı akım grafikleri ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.85'de gösterilmiştir.

Biyosensör için $y = -2,5x - 0,001$ ($R^2=0,995$) denkleminde göre doğrusal aralık 0,02 – 0,25 mM arasında bulunmuştur. Ayrıca biyosensör duyarlılığı ve LOD değeri sırası ile 5,0 $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ ve 2,1 μM olarak hesaplanmıştır. Biyosensörün kinetik parametrelerini belirlemesi için Lineweaver-Burk(LB) eşitliğe göre $1/C$ 'ye karşılık $1/I$ grafiği hazırlanmıştır (Şekil 4.85d). Buna göre Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/PPO biyosensörü için $y = -0,385x - 0,299$ ($R^2=0,992$) denkleminde K_m ve I_{max} sırasıyla 1,29 mM ve 3,34 μA olarak bulunmuştur.



Şekil 4.85. Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/PPO biyosensörünün **a)** akım – zaman; **b)** akım - katekol derişimi; **c)** kalibrasyon; **d)** Lineweaver-Burk grafikleri (0,10 M pH 7,5 fosfat tamponu, -0,15 V, oda sıcaklığı)

5. TARTIŞMA

Tezin amacı poli(2,5-ditiyeniilpirol) (PSNS) ve polipirol (PPy) tabanlı, literatürde bulunmayan çeşitli biyosensörlerin hazırlanması, özelliklerinin incelenmesi, optimizasyonu ve gerçek numunelerde analiz yapılmasıdır. Yapılan bu çalışma ile glikoz, fenol türevleri ve üre gibi insan sağlığına olumsuz etkileri nedeni ile kontrol altında tutulması gereken bileşiklerin kolay bir yöntem ile analizine olanak sağlanması hedeflenmiştir. Bu noktada kullanılması planlanan PSNS ve PPy türevi iletken polimer matrisler hedefe yönelik tasarlanmış olup, polimer yapısı ile biyosensör özellikleri arasındaki ilişkinin ortaya koyulması ve sonuçların bilim dünyası ile paylaşılması amaçlanmıştır. Bu tez çalışması ile monomer yapısı değişimi, kopolimerizasyon, medyatör kullanımı, sinyal artırıcı kullanımı, takip edilen bileşen gibi değişkenlerin hazırlanan biyosensörlerin performanslarına etkileri incelenmiştir.

PSNS türevleri son dönemde özellikle amperometrik biyosensörlerde elektroaktif matris olarak kullanılmışlardır. Tuncagil ve arkadaşları poli (4-(2,5-di(tiyofenil-2-il)-1H-pirol-1-il)) benzenamin [poli(SNSNH₂)] (Tuncagil 2011) ve poli(1-(4-nitrofenil)-2,5-di(2-tiyeniil)-1H-pirol) [poli(SNSNO₂)] (Tuncagil 2010) iletken polimerlerle glikoz oksidaz enzimi immobilizasyonu ile glikoz biyosensörüne başarıyla uygulamıştır. Ayrıca 4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)amidoferrosenilditiyo-fosfonat (SNS-NH₂-Fc) (Ayrancı 2015), 4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)bütan-1-amin (TPA) (Soğancı 2014), 4-amino-N-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benzamid (HKCN) (Güler 2014) gibi SNS tabanlı monomerlerden hazırlanan iletken polimerler çeşitli biyosensör uygulamalarında kullanılmıştır.

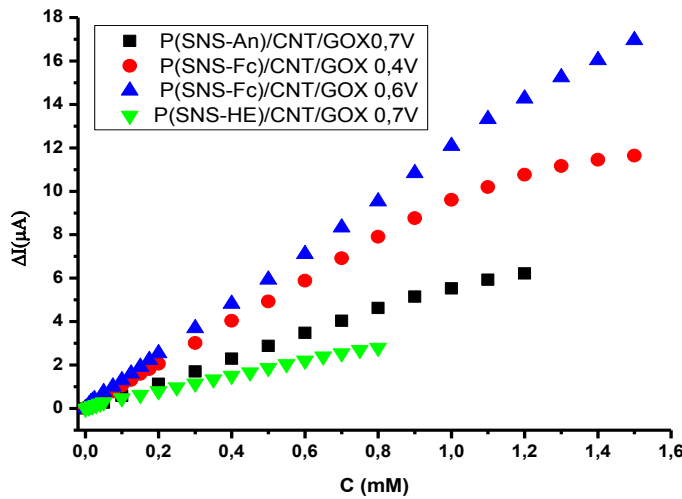
Tez kapsamında farklı yapıda beş SNS türevi (SNS-An, SNS-Et, SNS-N₃, SNS-HE ve SNS-Fc) ve Py-Fc monomer olarak sentezlenmiştir. Biyosensör hazırlanması için platin levhalar iletken polimerlerle uygun koşullarda kaplanmış ve daha sonra bu elektrotların bazılarının üzerine sinyal artırıcı olarak CNT veya C₆₀ yüklenmiştir. En son olarak analiz edilecek analite göre GOX, PPO veya üreaz enzimleri glutraldehit çapraz bağlayıcı ile immobilize edilmiştir. Hazırlanan tüm biyosensörler için polimer film kalınlığı, sinyal artırıcı miktarı, enzim miktarı, çalışma potansiyeli ve pH dikkate alınarak uygun hazırlama ve kullanım koşulları belirlenmiştir. Ayrıca her bir biyosensör analitik performansları yönünden değerlendirilmiş ve gerçek numune analizinde kullanılmıştır. Sentezlenen monomerlerden SNS-N₃ ve Py-Fc'nin elektrokimyasal polimerizasyonun sonucu hazırlanan iletken polimer filmlerin biyosensör hazırlanmasına imkân sağlayacak nitelikte olmadığı görülmüştür.

5.1. Glikoz Biyosensörleri

Tez kapsamında poli(2,5-ditiyeniilpirol) (PSNS) türevli iletken polimer matrisleri ile yapılan biyosensörlerin polimer için kullanılan monomerin yapısıyla ilişkisi incelenmiştir. Bilindiği gibi birinci nesil glikoz biyosensörlerin çalışma prensibi genelde enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H₂O₂ ürünün yükseltgenmesinin izlenmesi ya da bu enzimatik reaksiyonda tüketilen O₂'nin indirgenmesi reaksiyonun takip edilmesi esasına

göre analiz yapılmaktadır. Bu bağlamda biyosensör için yeterli oranda elektrot yüzeyine kaplanabilen P(SNS-An), P(SNS-Et), P(SNS-HE) ve P(SNS-Fc) iletken polimerleri ile glikoz biyosensörleri hazırlanmış ve bu biyosensörlerin özelliklerine hem hidrojen peroksitin yükseltgenmesi hem de kullanılan oksijenin takip edilmesiyle incelenmiştir.

Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 'in yükseltgenmesinin takip edildiği çalışmalarda Şekil 5.1'deki grafikten görüleceği gibi en yüksek duyarlılığı gösteren sensör P(SNS-Fc)/CNT/GOX'dır. Bu biyosensör 0,6 ve 0,4 V çalışma potansiyelinde sırasıyla 23,12 ve 18,42 $\mu A / (mM \cdot cm^2)$ duyarlılık göstermiştir. İkinci sırada 10,66 $\mu A / (mM \cdot cm^2)$ (0,7 V'da) duyarlılık ile P(SNS-An)/CNT/GOX, üçüncü sırada 7,06 $\mu A / (mM \cdot cm^2)$ (0,7 V'da) duyarlılık ile P(SNS-HE)/CNT/GOX ve en son sırada çok düşük değerlere sahip olduğundan tez kapsamında değerlendirilmeyen P(SNS-Et)/CNT/GOX bulunmaktadır. Söz konusu veriler monomer yapısına ferrosen bağlanmasıyla çalışma potansiyelinin önemli ölçüde azaldığını ve duyarlılığın arttığını göstermiştir. Bunun sonucu olarak girişim etkisinin ihmal edilecek seviyeye düştüğü ve seçiciliğini artırdığı görülmüştür.

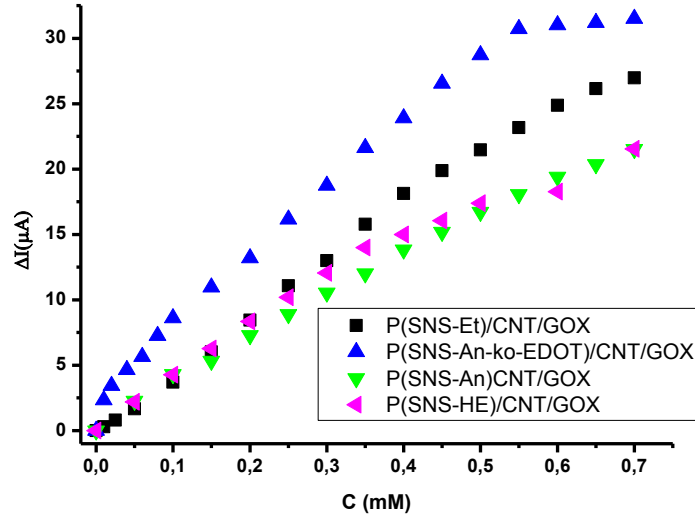


Şekil 5.1. H_2O_2 takibi yapılan biyosensörlerin karşılaştırılması

Literatür çalışmalarının önemli bir kısmı enzimatik reaksiyonlarda kullanılan oksijenin takip edildiği çalışmalar olup önemli bir kısmında duyarlılık değerleri hesaplanmıştır. Tezde elde edilen bulguların literatür ile karşılaştırılabilmesi için yayınlarda sunulan kalibrasyon eşitliklerinden yararlanılmıştır. Buna göre; Tuncagil vd. yaptıkları çalışmada $y = 1,597x + 0,264$ eşitliğinden 1,597 $\mu A / mM$ (Tuncagil 2011), Özdemir vd. yaptıkları çalışma ile $y = 8,582x + 2,945$ eşitliğinden 8,582 $\mu A / mM$ (Özdemir 2011) ve Tekbaşoğlu vd. çalışmaları sonucu $y = 10,871x + 5,959$ eşitliğinden 10,871 $\mu A / mM$ (Tekbaşoğlu 2017) olarak hesaplanmıştır.

Tez kapsamında oksijen takibi yapılarak incelenen biyosensörler arasında P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX ve P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörlerinin duyarlılıkları sırasıyla 104,96 ve 101,26 $\mu A / (mM \cdot cm^2)$ olarak öne çıkmaktadır (Şekil 5.2). Söz konusu yüksek duyarlılık değerleri Uçan vd.'nin çalışmaları hariç (237,1 $\mu A / (mM \cdot cm^2)$)

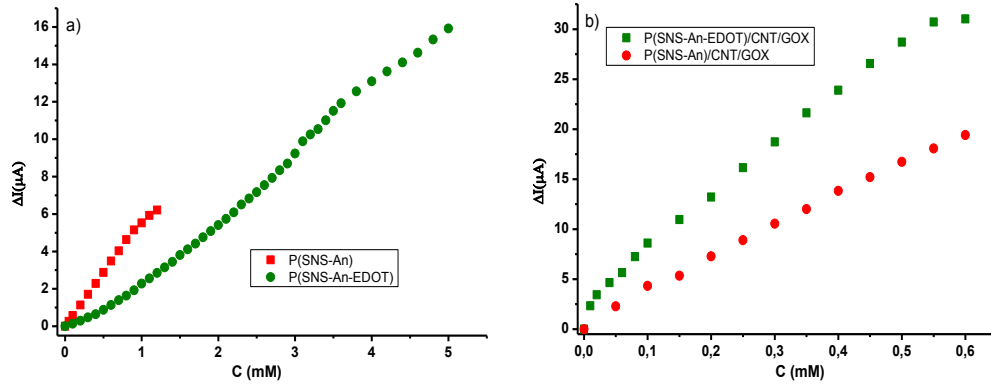
(Uçan 2014)) diğer çalışmalardan üstün niteliktedir. P(SNS-An –ko-EDOT)/CNT/GOX ve P(SNS-Et)/CNT/GOX biyosensörlerinin LOD değerleri sırasıyla 1,9 ve 1,7 μM gibi düşük değerler bulunmuştur. Literatürdeki 2,1 μM (Tuncagil 2011), 2,29 μM (Uzun 2013), 903 μM (Ayrancı 2015), 25 μM (Kesik 2013), 50 ve 10 μM (Emre 2011), 19 μM (Demirci 2012), 30 μM (Ekiz 2010), 176 μM (Tekbaşoğlu 2017) gibi değerlerden daha iyi sonuçlar bulunmuştur.



Şekil 5.2. Oksijen takibi yapılan biyosensörlerin karşılaştırılması (-0,7 V)

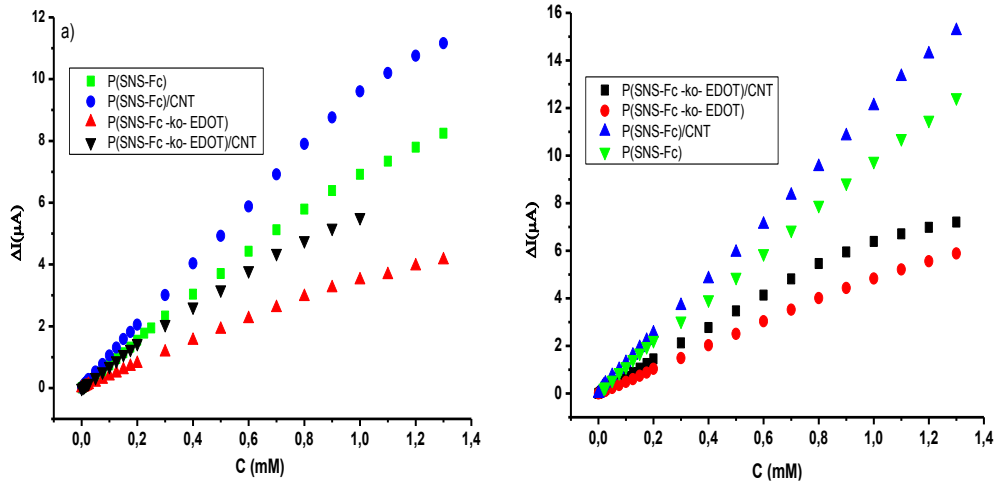
Kopolimerizasyon, polimerlerin çeşitli özelliklerini değiştirmek için yaygın olarak kullanılan en kolay uygulanabilir yöntemlerden biridir. İletken kopolimerler kullanarak hazırlanan biyosensörler, (1) elektrot yüzeyinde kolay ve doğrudan birikim, (2) kalınlık kontrolü, (3) redoks iletkenliği gibi birçok olumlu özellikten dolayı geleneksel yöntemlere alternatif olarak önerilmiştir (Söylemez 2013). Kopolimer bazlı biyosensörlerin oluşturulması için ana motivasyon sadece homopolimerinkinden daha iyi özellikler elde etmek değil aynı zamanda farklı analitler izlemek için hassas, basit ve seçici bir araç geliştirmektir (Turan 2014).

Bu sebeple tez çalışması kapsamında biyosensörlerde elektroaktif katman olarak kopolimer kullanılmasının etkisi de araştırılmıştır. Bu kapsamda P(SNS-An) ve P(SNS-An –ko- EDOT) glikoz biyosensörleri çalışılmıştır. Şekil 5.3'de görüldüğü gibi hidrojenperoksit ölçümüne bağlı çalışmalarda kopolimer kullanılmasının doğrusal aralığı genişlediği ve oksijen ölçümüne bağlı çalışmalarda ise duyarlılığı artırdığı görülmüştür.



Şekil 5.3. Glikoz biyosensörlerinde kopolimer etkisi **a)** 0,7 V; **b)** -0,7 V

Biyosensörlerde fulleren (C_{60}) ve çok duvarlı karbon nanotüp (CNT) elektron transferine katkı sağlamaları nedeni ile sinyal artırıcı olarak kullanılmışlardır (Patolsky 1998). Bu sebeple tez çalışmasında incelenen bir diğer konu ise bu tip malzemelerin biyosensör performansına etkisi olmuştur. Bu kapsamda P(SNS-Fc)/GOX, P(SNS-Fc –ko- EDOT)/GOX, P(SNS-Fc)/CNT/GOX ve P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/GOX enzim sensörleri hazırlanmış ve özellikleri incelenerek karşılaştırılmıştır. Şekil 5.4’de görülebileceği gibi CNT yüklenmiş elektrotların duyarlılıkları daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

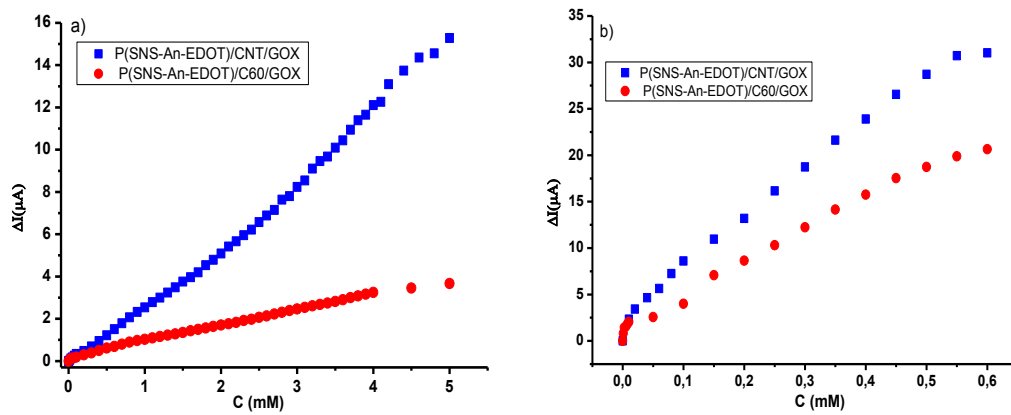


Şekil 5.4. SNS-Fc ile hazırlanan elektrotların **a)** 0,4 V; **b)** 0,6 V kalibrasyon grafiklerinin karşılaştırılması

Ayrıca, P(SNS-An –ko- EDOT) tabanlı glikoz biyosensörüne karbon nano materyel olarak C_{60} yüklenmiş ve hem -0,7 V hem de 0,55 V’da analitik performansı incelenmiştir. Biyosensörün -0,7 V çalışma potansiyelindeki duyarlılığı, K_m ve LOD değeri sırası ile $67,82 \mu A / (mM \cdot cm^2)$, 1,0 mM ve 51,7 μM hesaplanmıştır. Bu biyosensör için bulunan duyarlılığın literatürdeki $3,02 \mu A / (mM \cdot cm^2)$ (Gavalas 2000), $0,23 \mu A / (mM \cdot cm^2)$

(Zheilei 2009) ve $35,46 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Zhong 2012) diğer çalışmalardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Biyosensörün LOD değeri $51,7 \mu\text{M}$ olarak bulunmuş ve literatürdeki $13 \mu\text{M}$ (Gavalas 2000), $10 \mu\text{M}$ (Chang ve Shih 2000) ve $1,0 \mu\text{M}$ (Zhong 2012) çalışmalara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu biyosensör için hidrojenperoksit takibi yapılan çalışmada ise $0,55 \text{ V}$ potansiyelde duyarlılık $1,5 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$, $K_m = 5,01 \text{ mM}$ ve LOD değeri $22,3 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır.

P(SNS-An –ko- EDOT) tabanlı glikoz biyosensörlerinde yapılan çalışmalar sonucunda CNT ile hazırlanan biyosensörün duyarlılığının fulleren içeren biyosensöre göre daha yüksek olduğu (Şekil 5.5) tespit edilmiştir. Bilindiği gibi duyarlılığın yüksek olması seçiciliği artırdığından sonraki çalışmalarda CNT kullanılmıştır.



Şekil 5.5. P(SNS-An –ko- EDOT) ile hazırlanan glikoz biyosensörlerde CNT ve C_{60} karşılaştırması **a)** $0,6 \text{ V}$; **b)** $-0,7 \text{ V}$

Ferrosen ve türevleri mükemmel redoks davranışından dolayı elektroanaliz alanında yoğun ilgi uyandırmıştır. Ferrosen, elektrokimyasal olarak popüler aktif gruplardan biri olması ve Fc^+/Fc redoks reaksiyonunun tersinir olmasından dolayı elektrotların modifikasyonunda kullanılmışlardır (Zhilei 2009; Elanchezhian 2009; Qiu 2009; Raouf 2009). Sentezlenen P(SNS-Fc) maddesinin ferrosen içermesi biyosensör için iletici sistem olabileceği düşüncesini doğurmuş ve çalışmanın ikinci kısmında kullanılmıştır.

Ferrosen medyatörü içeren biyosensör olarak tasarlanmış Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX enzim elektrodun $0,4$ ve $0,6 \text{ V}$ daki duyarlılıkları sırasıyla $18,73$ ve $23,12 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ bulunmuştur. Bulunan duyarlılık değerlerinin literatürdeki çalışmalara $1,796 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Şenel 2011), $3,6$ ve $10,9 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Zhang 2010), $6,54 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Zamora 2007) $18,2 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Mertins 2009), $19,21 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Palomera 2011) göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ferrosen içeren monomerin (SNS-Fc) ferrosen gibi katalitik redoks özelliği gösteren bir medyatör içeriyor olması biyosensör uygulaması için avantaj teşkil etmiş ve bu biyosensörün hem birinci hemde ikinci nesil biyosensör olarak kullanılabilmesi düşündürmüştür.

Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX enzim elektrodun 0,4 ve 0,6 V daki LOD değeri sırasıyla 1,0 ve 0,7 μM olarak S/N değeri 3 baz alınarak ($n=10$) hesaplanmıştır. Bu LOD değerleri literatürdeki ferrosen içeren glikoz biyosensörleri ile yapılmış çalışmalar ile karşılaştırılacak olursa 180 μM (Ayrancı 2015), 30 μM (Soğancı 2014), 2,7 μM (Derviseviç 2015), 3,0 μM (Şenel 2010), 170 μM (Palomera 2011) gibi çalışmalardan daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX enzim elektrodun 0,4 ve 0,6 V daki Michaelis-Menten sabiti (K_m) sırasıyla 0,76 ve 0,8 mM olarak hesaplanmıştır. Bu K_m değerleri literatürdeki ferrosen içeren glikoz biyosensörleri ile yapılmış çalışmalar ile karşılaştırıldığında 3,86 mM (Ayrancı 2015), 20,23 mM (Soğancı 2014), 1,6 mM (Palomera 2011), 4,73 mM (Şenel 2011), 1,14 mM (Şenel 2010), 3,97 mM (Abasayanık 2010), bu çalışmalardan daha düşük değer bulunmuştur. Michaelis-Menten (K_m) sabiti enzim ve substrat arasındaki ilgiyi ifade etmektedir. Düşük substrat derişimlerinde enzimi doyurmak ancak enzim ile substrat arasındaki ilginin fazla olmasıyla mümkün olabilmektedir (Çolak 2014). K_m değerinin düşük olması enzim ile substrat arasındaki ilginin yüksek olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, hazırlanan biyosensörlerle ticari olarak satılan meyve sularında (Cappy vişne suyu, Cappy karışık meyve suyu, Cappy ramazan şerbeti, Tamek % 100 elma suyu) glikoz tayini yapılmıştır. Analiz sonuçları referans metot ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Ferrosen medyatörü ile hazırlanan biyosensörlerin (0,4 V'da) gerçek numune analiz sonuçları

Örnek	Vişne suyu (mg/L)	GK	Elma suyu (mg/L)	GK	Karışık meyve suyu (mg/L)	GK
HPLC	43,2 \pm 0,12		15,72 \pm 0,08		32,3 \pm 0,03	
P(SNS-Fc) /GOX	45,7 \pm 1,17	105,8	15,84 \pm 0,23	100,8	31,1 \pm 0,82	96,3
P(SNS-Fc)/CNT/GOX	41,98 \pm 0,51	97,2	15,38 \pm 0,35	97,84	32,23 \pm 0,84	99,8
P(SNS-Fc-ko-EDOT)/GOX	42,68 \pm 0,67	98,8	16,13 \pm 0,73	102,6	30,92 \pm 1,27	95,8
P(SNS-Fc-ko-EDOT)/CNT/GOX	42,63 \pm 0,25	98,7	16,18 \pm 0,32	102,9	30,9 \pm 0,8	95,7

GK: Geri kazanım.

Tüm biyosensörlerin tekrar kullanılabilirlikleri bakımından değerlendirilmesi 25 °C'de optimum şartlarda bir günde ard arda 20 ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Alınan ölçümler sonucunda genel olarak varyasyon katsayıları 3,0 ile 5,6 arasında değiştiği görülmüştür. En iyi sonucu Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX elektrodu ile elde edilmiş ve ölçümler sonucunda standart sapma \pm 0,125 ve varyasyon katsayısı (cv) % 3,02 ($n=20$)

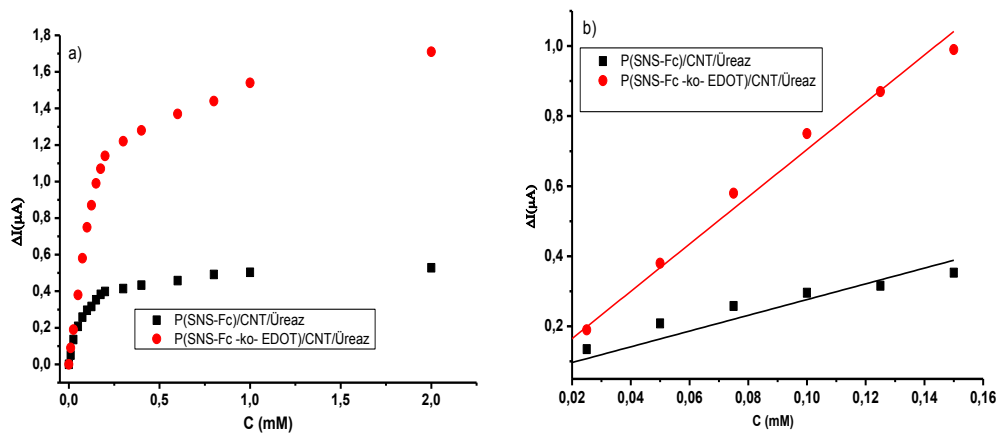
olarak hesaplanmıştır. Bu elektrot yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup 20. kullanımda bile % 93 aktivite göstermiştir.

Tüm biyosensörlerin aktivitelerinin optimum koşullarda haftada bir kontrol edilmesi ile raf ömrü tayini yapılmıştır. Genel olarak oksijen tüketiminin takip edildiği elektrotların raf ömrü kısa bulunurken, hidrojenperoksit takibi yapılan enzim elektrotlarının raf ömürlerinin daha uzun olduğu saptanmıştır. En iyi sonuçlar Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX enzim elektrodu ile elde edilmiş ve 135 gün boyunca aktivitelerinin kontrolüne devam edilmiştir. Biyosensörün 112. gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 94 oranında aktivite gösterdiği saptanmıştır. Uzun ömürlü biyosensör iş gücü ve maliyet açısından avantaj sağlamaktadır (Güler 2015). Bu durum PSNS yapısı ile ferrosenin bir araya getirilmesinin önemi vurgulamaktadır.

5.2. Üre Biyosensörleri

Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz ve Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörleri hazırlanmış ve optimize edilerek analitik özellikleri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda duyarlılık, LOD ve Michaelis-Menten sabitine bakılarak Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörün homopolimer ile hazırlanan biyosensöre göre gelişmiş özelliklerde olduğu saptanmıştır (Şekil 5.6).

Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörün kronoamperometrik çalışmaları sonucunda 0,01-0,15 mM doğrusal aralığı için $13,49 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ duyarlılık bulunmuş olup bu değer literatürdeki $0,8 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Masafara 2009), $12 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Meibodi 2014), $0,54 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Dervisevic 2017), $1,085 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Derviseviç, E 2017) ve $2,8 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Kuralay 2005) gibi çoğu çalışmanın duyarlılığından yüksektir.



Şekil 5.6. Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz ve Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörlerinin **a)** akım – derişim; **b)** doğrusal aralık grafikleri

Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörü için LOD değeri 1,9 μM olarak hesaplanmıştır. Bu değer, literatürdeki 5,0 μM (Ivanova 2012), 40 (Meibodi 2014), 12 (Dervisevic 2017), 50 (Derviseviç E 2017) gibi üre için yapılan çalışmaların çoğundan daha düşüktür. Bu biyosensör için Michaelis- Menten sabiti K_m değeri 0,252 mM hesaplanmış ve bu değer literatürdeki diğer veriler olan 2,2 mM (Meibodi 2014), 4,6 mM (Masafara 2009), 25,4 mM (Kuralay 2005) çalışmalardan daha iyi olduğunu belirlenmiştir.

Bu biyosensör için raf ömrü 10 gün için %95 iken 31 gün de %50 seviyesine inmiştir. Bu durum literatürdeki bazı çalışmalarla (15 gün %50 (Meibodi 2014)) benzerlik gösterirken 30 gün % 70 (Ivanova 2012) ve 30 gün % 90 (Şenel 2017) aktivite gösteren çalışmaların gerisinde kalmıştır. Bu biyosensör ile idrarda üre tayininde referans metot ile uyumlu sonuç elde edilmiştir.

5.3. Polifenol Biyosensörleri

Polifenol oksidaz enzimi ile Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO ve Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/PPO biyosensörleri hazırlanmıştır. Bu biyosensörler kurulum ve çalışma koşulları açısından optimize edilmiş ve analitik performansları incelenmiştir.

Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO biyosensörü için LOD değeri 3,9 μM olup bu değer literatürdeki bazı çalışmalardan 7,6 μM (Perez-Lopez 2011), 6,0 μM (Tembe 2007) ve 25 μM (Çevik 2013) daha küçük (daha iyi) ama 0,17 μM (Vicentini 2015), 0,84 μM (Apetrei 2011) gibi çalışmalardan daha büyüktür. Bu biyosensör için duyarlılık 6,82 $\mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ bulunmuş ve literatür ile karşılaştırıldığında 3,5 $\mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Rajesh 2004), 6,1 $\mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Yıldız 2007), 4,8 $\mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ (Perez-Lopez 2011) gibi çalışmalardan daha iyi olduğu görülmüştür.

Pt/P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/PPO biyosensörü için 0,02-0,25 mM doğrusal aralıkta duyarlılığı 5,0 $\mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ ve LOD değeri 2,1 μM bulunmuşken, Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO biyosensörü için ise 6,82 $\mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ duyarlılık ve LOD değeri 3,9 μM olarak bulunmuştur. P(SNS-Fc) ile yapılan biyosensörün K_m değeri 0,87 mM iken kopolimer ile yapılan biyosensörün 1,29 mM hesaplanmıştır. Duyarlılık ve K_m değerine bakıldığında P(SNS-Fc) homopolimeri ile yapılan biyosensörün daha uygun olduğu düşünülmüştür.

Çizelge 5.2. Tasarlanan biyosensörlerin analitik performansları

Biyosensör	Takip edilen bileşen	Potansiyel (V)	Duyarlılık ($\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Doğrusal aralık (mM)	Km (mM)	I _{max} (μA)	LOD (μM)
P(SNS-Fc)/GOX	H ₂ O ₂	0,6	19,46	0,01-1,0	1,63	24,94	0,43
P(SNS-Fc)/GOX	Medyatör	0,4	14,22	0,01-1,0	0,44	6,8	0,61
P(SNS-Fc)/CNT/GOX	H ₂ O ₂	0,6	23,12	0,01-1,5	0,8	14,7	1,0
P(SNS-Fc)/CNT/GOX	Medyatör	0,4	18,73	0,01-1,2	0,76	9,17	0,7
P(SNS-Fc-EDOT)/GOX	H ₂ O ₂	0,6	9,43	0,01-1,0	1,64	7,81	1,2
P(SNS-Fc-EDOT)/GOX	Medyatör	0,4	7,48	0,01-1,0	1,79	8,28	1,1
P(SNS-Fc-EDOT)/CNT/GOX	H ₂ O ₂	0,6	13,24	0,01-1,0	0,56	4,97	1,7
P(SNS-Fc-EDOT)/CNT/GOX	Medyatör	0,4	11,58	0,01-1,0	1,43	11,38	2,2
P(SNS-An)/CNT/GOX	H ₂ O ₂	0,7	10,66	0,05-1,20	5,56	30,49	
SNS-An/CNT/GOX	O ₂	-0,7	63,92	0,05-0,60	1,05	49,3	
P(SNS-An-co-EDOT)/ CNT/GOX	H ₂ O ₂	0,6	6,86	0,02-5,0	2,63	10,53	6,2
P(SNS-An-co-EDOT)/ CNT/GOX	O ₂	-0,7	104,96	0,02-0,6	0,49	51,81	1,9
P(SNS-An-co-EDOT)/ C ₆₀ /GOX	H ₂ O ₂	0,55	1,50	0,02-5,0	5,01	6,57	22,3
P(SNS-An-ko-EDOT)/ C ₆₀ /GOX	O ₂	-0,7	67,82	0,025-0,6	1,00	52,63	51,7
P(SNS-Et)/CNT/GOX	O ₂	-0,7	101,26	0,01-0,6	0,62	48,92	1,7
P(SNS-HE)/CNT/GOX	H ₂ O ₂	0,7	7,06	0,01-0,8	0,82	4,50	1,8
P(SNS-HE)/CNT/GOX	O ₂	-0,7	71,76	0,05-0,5	1,0	47,62	19
P(SNS-Fc-EDOT)/CNT/Üreaz	NH ₄ ⁺	-0,2	13,49	0,01-0,15	0,252	2,34	1,9
P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz	NH ₄ ⁺	-0,2	2,50	0,05-0,2	0,10	0,612	52,8
P(SNS-Fc)/CNT/PPO	Katekol	-0,15	6,82	0,02-0,25	0,874	2,81	3,9
P(SNS-Fc-EDOT)/CNT/PPO	Katekol	-0,15	5,00	0,02-0,25	1,29	3,34	2,1

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada platin levha yüzeyine SNS türevi (SNS-An, SNS-HE, SNS-Et ve SNS-Fc) iletken polimerlerle kaplanmıştır. İletken polimer kaplı elektrotların bazılarında sinyal artırıcı olarak CNT veya C₆₀ yüklendikten sonra glüteraldehit çapraz bağlayıcı ile enzim (GOX, PPO ve üreaz) immobilize edilmiştir. Glikoz biyosensörleri hem enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H₂O₂'nin yükseltgenmesinin takibi hem de bu enzimatik reaksiyonda tüketilen O₂'nin indirgenmesinin takip edilmesiyle analiz yapılmıştır. Ayrıca ferrosen içeren sistemlerde medyatör üzerinden glikoz analizi yapılmıştır. Hazırlanan elektrotlarla optimizasyon çalışmaları yapılmış ve bu biyosensörlerin analitik performansları incelenmiştir. Sentezlenen monomerlerden SNS-N₃ ve Py-Fc ile yapılan çalışmalarda ilgili iletken polimerlerin elektrot yüzeyine biyosensör çalışması için yeterince kaplanmadığı görülmüştür.

Hazırlanan glikoz biyosensörlerinde -0,7 V da yapılan ölçümlerde genel olarak 0,02 – 0,6 mM aralığında doğrusal ve LOD değeri genel olarak 1,7-1,9 µM bulunmuştur. Duyarlılık olarak 104,96 µA/ (mM. cm²) değer ile Pt/P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX elektrodunun en iyi biyosensör olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Michaelis- Menten sabiti olarak küçük değer (0,49 mM) olarak bu biyosensör için hesaplanmıştır.

Glikoz biyosensörlerde H₂O₂'nin yükseltgenmesinin takip edildiği çalışmalarda genel olarak duyarlılık 7,06-23,12 µA/ (mM.cm²) aralığında ve LOD değeri 0,43-6,2 µM arasında değiştiği ve K_m değeri 0,44-2,89 mM arasında değiştiği belirlenmiştir.

Homopolimer ile hazırlanan biyosensörler arasında en yüksek duyarlılığı gösteren sensör P(SNS-Fc)/CNT/GOX'dır. Bu biyosensör 0,6 ve 0,4 V çalışma potansiyelinde sırasıyla 23,12 ve 18,42 µA/ (mM.cm²) duyarlılık göstermiştir. İkinci sırada 10,66 µA/ (mM. cm²) (0,7 V'da) duyarlılık ile P(SNS-An)/CNT/GOX, üçüncü sırada 7,06 µA/ (mM. cm²) (0,7 V'da) duyarlılık ile P(SNS-HE)/CNT/GOX ve en son sırada P(SNS-Et)/CNT/GOX bulunmaktadır. Söz konusu veriler monomer yapısına medyatör olarak ferrosen bağlanmasıyla duyarlılığın arttığını göstermiştir.

P(SNS-An –ko- EDOT) tabanlı glikoz biyosensörlerinde CNT ve fulleren etkisi incelenmiştir. CNT yüklenmiş glikoz biyosensörünün duyarlılığının yüksek ve LOD değerinin daha düşük olduğu görülmüş ve daha sonraki çalışmalarda CNT tercih edilmiştir.

SNS-An ile EDOT kopolimeri ile hazırlanan biyosensör H₂O₂ takibi yapılan çalışmalarında 0,01-5,0 mM aralığında 6,86 µA/(mM. cm²) duyarlılığa sahipken P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörü için 0,05-1,2 mM aralığında 10,66 µA/(mM. cm²) duyarlılık hesaplanmıştır. P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörü oksijen takibi yapılan çalışmada 0,02-0,55 mM doğrusal aralığında 104,96 µA/ (mM. cm²) duyarlılığa sahip iken, P(SNS-An)/CNT/GOX biyosensörü ise 0,05-0,6 mM doğrusal aralıkta 63,92 µA/(mM. cm²) duyarlılık göstermiştir. Biyosensörlerde kopolimer kullanılması oksijen takibinde duyarlılığı oldukça artırmış ve hidrojenperoksit takibinde ise doğrusal aralığı genişletmiştir. Ayrıca, kopolimer tabanlı biyosensörlerin raf ömrü daha uzun olduğu belirlenmiştir.

P(SNS-Fc –ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensörü için (0,4 V) duyarlılık 11,58 µA/(mM. cm²), K_m 1,63 mM ve LOD değeri 2,2 µM bulunmuşken, P(SNS-

Fc)/CNT/GOX için duyarlılık $18,73 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$, K_m $0,76 \text{ mM}$ ve LOD değeri $0,7 \mu\text{M}$ hesaplanmıştır. Yukarıdaki değerlerden anlaşıldığı üzere biyosensörün kopolimer tabanlı olarak yapılması medyatör olan ferrosenin özelliğini azalttığı görülmüştür. P(SNS-Fc) ile yapılan çalışmalarda SNS birimine ferrosen bağlı olmasının elektron transferinin hızlı gerçekleşmesini sağladığı, geri dönüşümlü elektron prosesini gerçekleştirmesini sağladığı ve kararlılığı artırdığı gözlemlenmiştir.

Tasarlanan biyosensörler ile ticari meyve suları kullanılarak glikoz tayini yapılmış ve dört biyosensörde (Pt/P(SNS-Fc)/GOX, Pt/P(SNS-Fc)/CNT/GOX, Pt/P(SNS-Fc –ko-EDOT)/GOX ve Pt/P(SNS-Fc –ko-EDOT)/CNT/GOX)) de $0,4 \text{ V}$ sabit potansiyelde referans metot ile daha tutarlı sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışmasında Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz ve Pt/P(SNS-Fc –ko-EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörleri hazırlanmış ve analitik özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda Pt/P(SNS-Fc –ko-EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörünün duyarlılığı $13,49 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$ ve LOD değeri $1,8 \mu\text{M}$ olarak tespit edilmiş ve genel olarak kopolimer ile hazırlanan biyosensörün homopolimer ile hazırlanana göre daha iyi performans gösterdiği belirlenmiştir. Merkezi laboratuvardan alınan idrar numunesi ile yapılan analiz sonucunda referans metotla uyumlu sonuçlar bulunmuştur.

Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO ve Pt/P(SNS-Fc –ko-EDOT)/CNT/PPO polifenol biyosensörleri hazırlanmıştır. Analitik performanslarını incelenmiştir. P(SNS-Fc)/CNT/PPO biyosensörün duyarlılık $6,82 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$, LOD değeri $3,9 \mu\text{M}$ ve K_m $0,874 \text{ mM}$ olarak bulunmuş ve Pt/P(SNS-Fc –ko-EDOT)/CNT/PPO biyosensörü için duyarlılığı $5,0 \mu\text{A}/(\text{mM} \cdot \text{cm}^2)$, LOD değeri $2,1 \mu\text{M}$ ve K_m değeri $1,29 \text{ mM}$ bulunmuştur. Sonuçlar karşılaştırıldığında kopolimer ile yapılan polifenol biyosensörünün daha iyi performans gösterdiği belirlenmiştir.

7. KAYNAKLAR

- Abashev, G. G., Bushueva, A. Y. and Shklyueva, E. V. 2011. N-substituted 2,5-di(2-thienyl)pyrroles: application, production, properties, and electrochemical polymerization. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 47: 130-154.
- Abasıyanık M.F. and Senel M. 2010. Immobilization of glucose oxidase on reagentless ferrocene-containing polythiophene derivative and its glucose sensing application, *J. Electroanal. Chem.* 639: 21.
- Anık, Ü. 2012. Biyosensörler: Metodlar, uygulamalar ve son gelişmeler. Ege Üniversitesi, 93-110.
- Anonymous 1, http://arasains.co.id/product_70_Biochemistry-Analyzer [Son erişim tarihi: 10.11.2017].
- Apetrei, C., Rodriguez-Mendez, M.L. and De Saja, J.A. 2011. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. application for detection of phenolic compounds, *Electrochim. Acta* 56: 8919–8925.
- Aydın, Y. 2012. İletken polimerlerin içerisinde enzim tutuklamasıyla yapılan biyosensörler. Yüksek Lisans tezi. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Karaman.
- Ayhan, F., Kaya, G. ve Ayhan, H. 2014. Homosistein-BSA-afinite temelli biyosensör tasarımı. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]* 39(3):383–396.
- Ayrancı, R., Demirkol, D. O., 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: 1389-1403.
- 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
- Ayrancı, R. 2013. Organik-inorganik hibrit iletken polimerlerin sentezi, elektrokromik ve biyosensör uygulamaları. Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Banica, F.G. 2012 *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Application*. Willey, pp. 135-153. İngiltere.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S. and Ananthanarayan, L. 2009. Glucose oxidase-an overview. *Biotechnology Advances*, 27: 489-501.
- Bas, S.Z. 2011. Ksantin tayini için amperometrik enzim elektrotlarının geliştirilmesi. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Beskan, U. 2011. Glikoz tayini için polianilin-polivinilsülfonat filme glikoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-50 s.
- Bicil, Z., Çamurlu, P., Yücel, B. and Becer, B. 2013. Multichromic, ferrocene clicked poly(2,5-dithienylpyrrole)s *J Polym Res* 20:228.
- Bingöl, B., Camurlu, P. and Toppare L. 2006. Synthesis and characterization of poly(thiophen-3-yl acetic acid 4-pyrrol-1-yl phenyl ester-co-N-methylpyrrole) and its application in an electrochromic device. *J. Appl. Polym. Sci.*, 100: 1988-1994.
- Burroughes, J. H., Bradley, D. D. C., Brown, A. R., Marks, R. N. and Mackay, J. 1990. Light-emitting diodes based on conjugated polymers. *Nature*, 347: 539-541.
- Can, F. 2010. Glikoz oksidaz enziminin iletken polimerlere immobilizasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
- Chang, M. and Shih, J. 2000. Fullerene–cryptand-coated piezoelectric crystal membrane glucose enzyme sensor. *Sensors and Actuators B* 67: 275–281
- Choi, D. H., Wang, Q., Azuma, Y., Majim, Y., Warner, J. H., Miyata, Y., Shinohara, H. and Kitaura, R. 2013. Fabrication and characterization of fully flattened carbon nanotubes: A new graphene nanoribbon analogue. *Nature Scientific Reports*, 3: 1617, 1-5.
- Cravino, A. and Sariciftci, N. S. 2002. Double-cable polymers for fullerene based organic optoelectronic applications. *Journal of Materials Chemistry*, 12: 1931-1943.
- Camurlu, P., Tarkuc, S., Sahmetlioglu, E., Mecidoglu Akhmedov, I., Tanyeli, C. and Toppare, L. 2008. Multichromic conducting copolymer of 1-benzyl-2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole with EDOT. *Solar Energy Materials & Solar Cells* 92: 154–159.
- Camurlu, P., Gültekin, C. ve Bicil, Z. 2012. Fast switching, high contrast multichromic polymers from alkyl-derivatized dithienylpyrrole and 3,4-ethylenedioxythiophene. *Electrochimica Acta* 61: 50– 56.
- Camurlu, P. and Karagören, N. 2013. Clickable, versatile poly(2,5-dithienylpyrrole) derivatives. *Reactive and Functional Polymers*, 73: 847-853.
- Camurlu, P., Güven, N. and Bicil, Z. 2016. Ferrocene clicked polypyrrole derivatives: effect of spacer group on electrochemical properties and post-polymerization functionalization. *Designed Monomers and Polymers*, DOI: 10.1080/15685551.2015.1136526.
- Catalkaya, H. 2011. Grafit elektrot üzerinde elektropolimerizasyon ile polianilin kopolimerinin sentezi, karakterizasyonu ve amperometrik biyosensör olarak uygulaması. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Cevik, E., Senel, M., Abdulhadi Baykal, A. and Abasıyanık, M.F. 2013. *Current Applied Physics* 13: 1611-1619.
- Cil, M. 2006. Immobilization of glucose oxidase and polyphenol oxidase in poly(N-(4-(3-thienyl methylene)-oxycarbonylphenyl) maleimide)-co- pyrrole) matrice. Yüksek lisans tezi, ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Colak, Ö. 2014. Sakkaroz tayini için biyosensör hazırlanması. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Demirci, S., Emre, F. B., Ekiz, F., Oguzkaya, F., Timur, Tanyeli, C., and Toppare L. 2012. Functionalization of poly-SNS-anchored carboxylic acid with Lys and PAMAM: surface modifications for biomolecule immobilization/stabilization and bio-sensing applications. *Analyst*, 137: 4254–4261.
- Dervisevic, M., Şenel, M. and Çevik, E. 2015. Development of glucose biosensor based on reconstitution of glucose oxidase onto polymeric redox mediator coated pencil graphite electrodes. *Enzyme and Microbial Technology* 68: 69–76
- Dervisevic, M., Dervisevic, E., Şenel, M., Çevik, E., Yıldız, H. B. and Çamurlu, P. 2017. Construction of ferrocene modified conducting polymer based amperometric urea biosensor, *Enzyme and Microbial Technology* 102: 53–59.
- Dervisevic, E., Dervisevic, M., Nyangwebah J. and Şenel M. 2017. Development of Novel Amperometric Urea Biosensor based on FcPAMAM and MWCNT bio-nanocomposite film . *Sensors and Actuators B*, 02: 122.
- Dhawan, G., Sumana, G. and Malhotra, B.D. 2009. Recent developments in urea biosensors. *Biochemical Engineering Journal* 44: 42–52.
- Ekiz, F., Yuksel, M., Balan, A., Timur, S. ve Toppare L. 2010. Electrochemical Polymerization of (2-Dodecyl-4,7-di(thiophen-2-yl)-2H-benzo[d][1,2,3]triazole): A Novel Matrix for Biomolecule Immobilization. *Macromol. Biosci.* 10: 1557–1565
- Elanchezhian, V.S. ve Kandaswarny, M., 2009. Ferrocene-based multisignaling sensor molecule functions as a molecular switch. *Inorg. Chem. Commun.* 12: 161–165.
- Emre, F. B., Ekiz, F., Balan, A., Emre, S., Timur, S. and Toppare L. 2011. Conducting polymers with benzothiadiazole and benzoselenadiazole units for biosensor applications. *Sensors and Actuators B*, 158: 117–123
- Foulds, N. C. and Lowe, C. R. 1986. Enzyme Entrapment in Electrically Conducting Polymers. *J. Chem. SOC., Faraday Trans. I*,82: 1259-1264.
- Foulds, N.C. and Lowe, C. 1988. Immobilization of glucose oxidase in ferrocene-modified pyrrole polymers. *Anal. Chem.* 60: 2473.
- Gavalas, V. G. and Chaniotakis, N.A. 2000. [60]Fullerene-mediated amperometric biosensors. *Analytica Chimica Acta* 409: 131–135

- Gerard, M., Chaubey, A. and Malhotra, B. D. 2002. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 17: 345–359.
- Guilbault, G. and Lubrano, G. 1973. An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose, *Anal. Chim. Acta* 64: 439-455.
- Guimard, N. K., Gomez, N. and Schmid, C. E. 2007. Conducting polymers in biomedical engineering. *Prog. Polym. Sci.* 32: 876–921.
- Guler, E., Soyleyici, H. C., Demirkol, D. O., Ak, M. and Timur, S. 2014. A novel functional conducting polymer as an immobilization platform. *Materials Science and Engineering C*, 40: 148–156.
- Güler, M. 2015. Biyolojik sıvılarda klinik öneme sahip bazı maddelerin tayinine yönelik biyosensör geliştirme. Doktora tezi, Yüzüncü yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Güven, N. 2016. Klık kimyası ile fonksiyonlandırılmış poli(2,5-ditiyenilpirol) türevlerinin sentezi ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Antalya.
- Habermüller, K., Mosbach, M. and Schuhmann, W. 2000. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *fresenius J Anal Chem*, 366: 560–568.
- Heeger, A.J. 2001. Semiconducting and metallic polymers: The fourth generation of polymeric materials. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105 (36): 8475-8491.
- Hirschmann, T. C., Araujo, P. T., Muramatsu, H., Zhang, X., Nielsch, K., Kim, Y. A. and Dresselhaus, M. S. 2013. Characterization of bundled and individual triple walled carbon nanotubes by resonant raman spectroscopy. *ACS Nano*, 7 (3): 2381- 2387.
- Horowitz, G. 1998. Organic field-effect transistors. *Adv. Mater.* 10: 365-377.
- Ivanova, S., Ivanov, Y. and Godjevargova T. 2013. Urea Amperometric Biosensors Based on Nanostructured Polypyrrole and Poly Ortho-Phenylenediamine. *Journal of Applied Biosensor*, 2: 12-19
- Kanik, F.E., Kolb, M., Timur, S., Bahadır, M. and Toppare, L. 2013. An amperometric acetyl-choline biosensor based on a conducting polymer, *Int. J. Biol. Macromolecule*, 59: 111–118.
- Kıralp, S., Toppare, L. and Yağcı, Y. 2003. Immobilization Of polyphenol oxidase in conducting copolymers and determination of phenolic compounds in wines with enzyme electrodes, *Int. J. Biol. Macromol.* 33: 37–41.
- Kesik, M., Kanik, F.E., Turan, J., Kolb, M., Timur, S., Bahadır, M. and Toppare, L. 2014. An acetylcholinesterase biosensor based on a conducting polymer using multiwalled carbon nanotubes for amperometric detection of organophosphorous pesticides *Sensors and Actuators B Chemical* 205: 39–49.
- Kumar, D. and Sharma, R.C. 1998. Advances in conductive polymers. *European polymer journal*, 34(8): 1053-1060.

- Kuralay, F., Ozyoruk, H. and Yıldız, A. 2006. Amperometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film. *Sensors and Actuators B* 114: 500–506
- Li, S., Singh, J., Li, H. and Banerjee, I. A. 2011. Biosensor Nanomaterials. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Malhotra, B.D., Chaubey, A. and Singh, S.P. 2006. Prospects of conducting polymers in biosensors. *Analytica Chimica Acta* 578: 59–74.
- Massafera, M. P. and Torresi, S. I. C. 2009. Urea amperometric biosensors based on a multifunctional bipolymeric layer: Comparing enzyme immobilization methods. *Sensors and Actuators B* 137: 476–482.
- Meibodi, A. S. E. and Haghjoo, S. 2014. Amperometric Urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrochemically polymerized film of polyaniline containing MWCNTs. *Synthetic Metals* 194: 1–6.
- Merkoçi A., 2013. Nanoparticles based electroanalysis in diagnostics applications. *Electroanalysis*, 25: 15-27.
- Mertins O., Buriez O., Labbe, E., Fang, P.-P., Hillard, E., Vessieres, A., Jaouen, G., Tian, Z.- Q. and Amatore 2009. Further insights into hydrophobic interactions between ferrocenyl-tamoxifen drugs and non-polar molecular architectures at electrode surfaces. *J. Electroanal. Chem.* 635: 13–19.
- Ming, L., Yangping W., Dong L, Yue, R., Xu, J., Haohua H. 2011. A stable sandwich-type amperometric biosensor based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)–single walled carbon nanotubes/ascorbate oxidase/nafiion films for detection of L-ascorbic acid. *Sensors and Actuators B* 159: 277–285.
- Nien, Po-C., Tung, T.-S. and Ho, K.-C. 2006. Amperometric glucose biosensor based on entrapment of glucose oxidase in a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) film. *Electroanalysis* 18: 1408 – 1415.
- Özdemir, Ç., Tuncagil, S., Demirkol, D. O., Timur, S. and Toppare, L. 2011. Design of carbon nanotube modified conducting polymer for biosensing applications, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 48,7: 503-508.
- Özöner, Ş. 2010. Horseradish peroxidase enzimi kullanılarak amperometrik fenol biyosensörlerinin geliştirilmesi. Doktora tezi, Gebze İleri teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli
- Özyılmaz, G. 2005. Glikoz oksidaz ve katalazın ayrı ayrı ve birlikte immobilizasyonu ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Qiu, J.D., Zhou, W.M., Guo, J., Wang, R., and Liang, R.P., 2009. Amperometric sensor based on ferrocene-modified multiwalled carbon nanotube nanocomposites as electron mediator for the determination of glucose. *Anal. Biochem.* 385: 264–269.

- Palomera, N.; Vera, J.L., Meléndez, E., Ramirez-Vick, J.E., Tomar, M.S., Arya, S.K., and Singh, S.P. 2011. Redox active poly(pyrrole-N-ferrocene-pyrrole) copolymer based mediator-less biosensors. *J. Electroanal. Chem.* 658: 33–37.
- Pan, D., Chen, J., Yao, S., Tao, W. and Nie, L. 2005. An amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in electropolymerized poly(o-aminophenol) and carbon nanotubes composite film on a gold electrode. *Anal. Sci.* 21: 367-371.
- Patolsky, F., Tao, G., Katz, E. and Willner, I. 1998. C₆₀ -mediated bioelectrocatalyzed oxidation of glucose with glucose oxidase. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 454: 9–13.
- Perez-Lopez, B. and Merkoci, A. 2011. Magnetic nanoparticles modified with carbon nanotubes for Electrocatalytic magnetoswitchable biosensing applications, *Adv. Funct. Mater.* 21: 255–260.
- Pınarbası, Z. A. 2009. Ürikaz enziminin polipirol-polivinilsülfonat filme immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Rajesh, W. Takashima, and Kaneto, K. 2004. Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase onto an electrochemically prepared novel copolymer poly(N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film, *Sens. Actuators B* 102: 271–277.
- Raouf, J.B., Ojani, R., and Kolbadinezhad, M., 2009. Voltammetric sensor for glutathione determination based on ferrocene-modified carbon paste electrode. *J. Solid State Electrochem.* 13: 1411–1416.
- Reynolds, J. R., Hsu, S. G. and Arnott, H. J. 1989. The effect of growth morphology on the electrochemical response of poly(3-methylthiophene). *Polym. Sci., Phys. Ed.*, 27: 2081-2103.
- Roncali, J. 1992. Conjugated poly(thiophenes): synthesis, functionalization, and applications. *Chem. Rev.* 92: 711.
- Sacak, M. 2010. Polimer Kimyası. Gazi kitabevi, Ankara, 423-433 s.
- Schuchman, W. 1995. Conducting polymer based amperometric enzyme electrodes. *Mikrochim. Acta*, 121: 1-29.
- Somani, P.R. and Radhakrishnan, S. 2002. Effect of solid polymer electrolyte on the sensitization of photocurrents in solid-state electrochemical cells using conducting polypyrrole. *Mater. Chem. Phys.* 77: 117.
- Sogancı, T., Demirkol, D. O., Ak, M. and Timur, S. 2014. A novel organic – inorganic hybrid conducting copolymer for mediated biosensor applications . *RSC Adv.* 4: 46357–46362.

- Sogancı, T. 2014. Ferrosenil ditiyofosfonat içeren iletken polimerlerin sentezi ve biyosensör uygulamaları. Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Söylemez, S., Ekiz Kanik, F., Goycek Nurioglu, A., Akpınar, H. and Toppare, L. 2013. A Novel conducting copolymer: Investigation Of its matrix properties for cholesterol biosensor applications, *Sens. Actuat. B-Chem.* 182: 322–329.
- Sahin, M. 2014. Etanol-metanol karışımının tayini için yüzey baskılı elektrotların modifiye edilmesiyle amperometrik alkol biyosensörünün geliştirilmesi Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Senel M. and Abasıyanık MF. 2010. Construction of a novel glucose biosensor based on covalent immobilization of glucose oxidase on poly(glycidyl methacrylate-co-vinylferrocene). *Electroanalysis* 22: 1765–71.
- Senel, M. 2011. Construction of reagentless glucose biosensor based on ferrocene conjugated polypyrrole. *Synth. Met.* 161: 1861–1868.
- Tekbasoğlu T., Sogancı, T., Ak, M., Koca, A. and Sener, M. K. 2017. Enhancing biosensor properties of conducting polymers via copolymerization: Synthesis of EDOT-substituted bis(2-pyridylimino) isoindolato-palladium complex and electrochemical sensing of glucose by its copolymerized film. *Biosensors and Bioelectronics* 87: 81–88
- Telefoncu, A. ve Kılınc, A. 2012. Biyosensörler: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1-189.
- Telefoncu, A. 1999. Biyoreseptör immobilizasyonu. Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, Kuşadası, 42-61.
- Tembe, S., Inamdar, S., Haram, S., Karve, M. and D'Souza, S.F. 2007. Electrochemical biosensor for catechol using agarose-guar gum entrapped tyrosinase, *J. Biotechnol.* 128: 80–85.
- Timur, S. 2001. Pestisit tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Tuncagil, S., Odacı, D., Varis, S., Timur, S. and Toppare, L. 2009. Electrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1 H-pyrrole as a novel immobilization platform for microbial sensing. *Bioelectrochemistry*, 76: 169-174.
- Tuncagil, S., Varis, S. and Toppare, L. 2010. Design of a biosensor based on 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1H pyrrole. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64: 195-199.
- Tuncagil, S., Özdemir, C., Demirkol, D. O., Timur, S. and Toppare, L. 2011. Gold nanoparticle modified conducting polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole-1-l) benzenamine for potential use as a biosensing material. *Food Chemistry*, 127: 1317–1322.

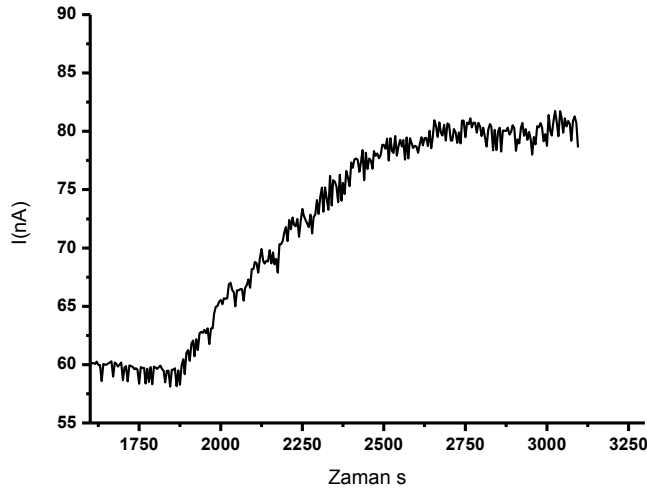
- Turan, J., Kesik, M., Söylemez, S., Göker, S., Kolb, M., Bahadır, M. and Toppare L. 2014. Development of an amperometric biosensor based on a novel conducting copolymer for detection of anti-dementia drugs. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 735: 43–50.
- Türkmen E, Bas SZ, Gülce H. and Yıldız S. 2014. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerization poly(o-phenylenediamine) film on platinum nanoparticles-polyvinylferrocenium modified electrode. *Electrochim Acta* 123: 93–102.
- Ucan D., Kanik, F. E., Karatas, Y. and Toppare, L. 2014. Synthesis and characterization of a novel polyphosphazene and its application to biosensor in combination with a conducting polymer. *Sensors and Actuators B* 201: 545–554
- Ucan, D. 2015. Poli(metoksietoksi)etoksi –ko- 3-formilfenoksi)fosfazen’in sentezi ve biyosensör uygulamalarında kullanımı. Yüksek lisans tezi, Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir.
- Uzun, S. D., Unlu, N.A., Kanık, F. E., Timur, S. and Toppare, L. 2013. A novel promising biomolecule immobilization matrix: Synthesis of functional benzimidazole containing conducting polymer and its biosensor applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 112: 74–80
- Vicentini, F.C., Garcia, L.L.C., Figueiredo-Filho, L.C.S., Janegitz, B. C. and Fatibello-Filho, O. 2016. A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water. *Enzyme and Microbial Technology* 84: 17–23
- Vidal, J. C., Ruiz, E. G. and Castillo, J. R. 2003. Recent advances in electropolymerized conducting polymers in amperometric biosensors. *Microchimica Acta*, 143: 93–111.
- Wang, J. 2001. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. *Electroanal. Chem.* 13: 983–988.
- Wong, C. M., Wong, K. H. and Chen, X. D. 2008. Glucose Oxidase: Natural Occurrence, Function, Properties and Industrial Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78: 927–938.
- Yıldız, E., Çamurlu, P., Tanyeli, C., Akhmedov, İ. and Toppare, L. 2008. A soluble conducting polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzenamine and its multichromic copolymer with EDOT. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 612: 247–256.
- Yıldız, H.B., Castillo, J., Guschin, D.A., Toppare, L. and Schuhmann, W. 2007. Phenol Biosensor based on electrochemically controlled integration of tyrosinase in a redox polymer, *Microchim. Acta* 159: 27–34.
- Yücel, A. 2013. Çoklu enzim esaslı biyosensör geliştirilmesi. Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

- Zamora, M., Herrero, S., Losada, J., Cuadrado, I., Casado, C.M. and Alonso, B. 2007. Synthesis and electrochemistry of octamethylferrocenyl-functionalized dendrimers, *Organometallics* 26: 2688–2693.
- Zeyrek, D.K. 2010. Kolesterolün ve fenolik bileşiklerin tayini için amperometrik enzim elektrotların hazırlanması. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Zhang, Z.B., Yuan, S.J., Zhu, X.L., Neoh, K.G. and Kang, E.T. 2010. Enzyme-mediated Amperometric biosensors prepared via successive surface-initiated atom-transfer radical polymerization, *Biosens. Bioelectron.* 25: 1102–1108.
- Zhilei, W., Zaijun, L., Xiulan, S., Yinjun, F. and Junkang, L. 2010. Synergistic contributions of fullerene, ferrocene, chitosan and ionic liquid towards improved performance for a glucose sensor. *Biosensors and Bioelectronics* 25: 1434–1438.
- Zhong, X., Yuan, R. and Chai, Y. 2012. In situ spontaneous reduction synthesis of spherical Pd@Cys-C60 nanoparticles and its application in nonenzymatic glucose biosensors. *Chem. Commun.*, 48: 597–599.

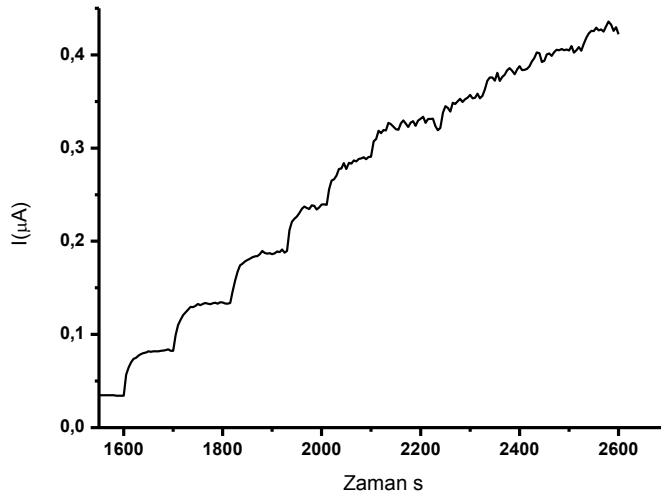
8. EKLER

8.1.GCE ve Pt Disk Çalışmaları

Platin disk ve GCE elektrotları çıplak ve iletken polimer (PPy veya P(SNS-An)) kaplı olarak çalışmalar yapılmıştır. Bu elektrotlar ile yapılan amperometrik çalışmalar sonucunda çalışma aralığının dar olması, tekrarlanabilirliğinin az olması ve sinyallerin düzgün olmamasından dolayı daha sonraki çalışmalarda çalışma elektrodu olarak 0,5 x 0,5 cm kesitinde platin levha elektrodu kullanılmıştır.



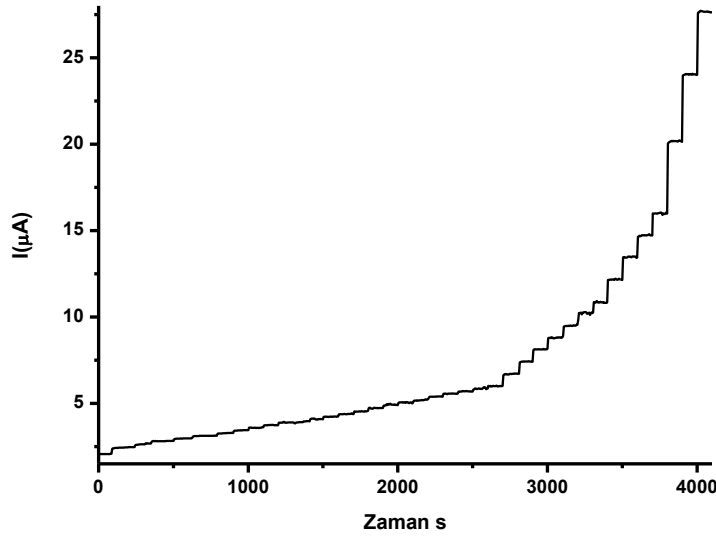
Şekil 8.1: GCE/P(SNS-An-ko-EDOT)/CNT/GOX için akım – zaman grafiği (0,7 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)



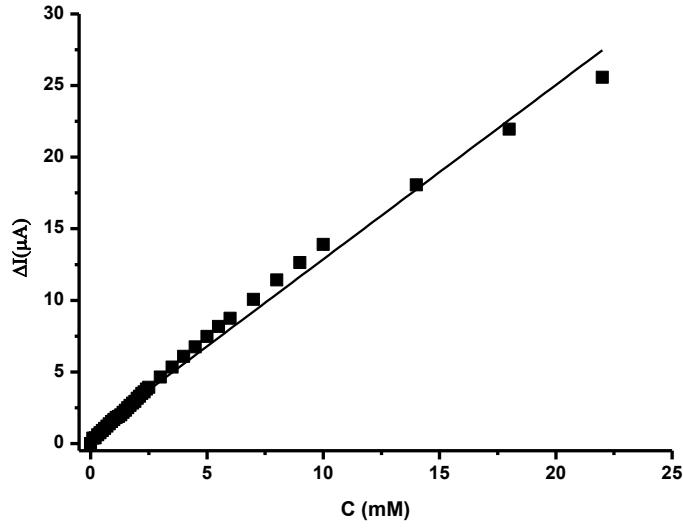
Şekil 8.2. Ptdisk/P(SNS-An-ko-EDOT)/CNT/GOX için akım – zaman grafiği (0,7 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

8.2. Pt/P(SNS-An-ko-EDOT)/CNT Biyosensörü için Hidrojenperoksitin Substrat Olarak Kullanıldığı Çalışmalar

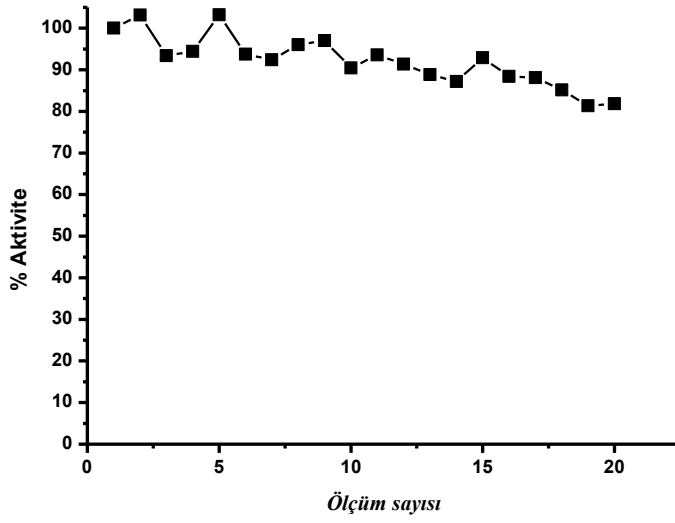
Elektrodun H_2O_2 'e karşı duyarlılığının incelenmesi için, GOX içermeyen bir çalışma elektrodu hazırlanmış ve 3 elektrotlu hücrede sabit miktarda H_2O_2 ile muamele edilmiştir. Şekil 8.3.'de ilgili çalışmanın akım-zaman grafiği görülmektedir. Elektrodun katalitik akımı artan H_2O_2 derişimiyle artmaktadır. Amperometrik analiz sonucu 0,05 – 18,0 mM arasında doğrusal aralık bulunmuştur.



Şekil 8.3. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT elektrodun H_2O_2 substrata karşı gösterdiği akım – zaman grafiği (0,7 V; pH=7,0; 0,1 M fosfat tamponu, oda koşullarında 25°C)

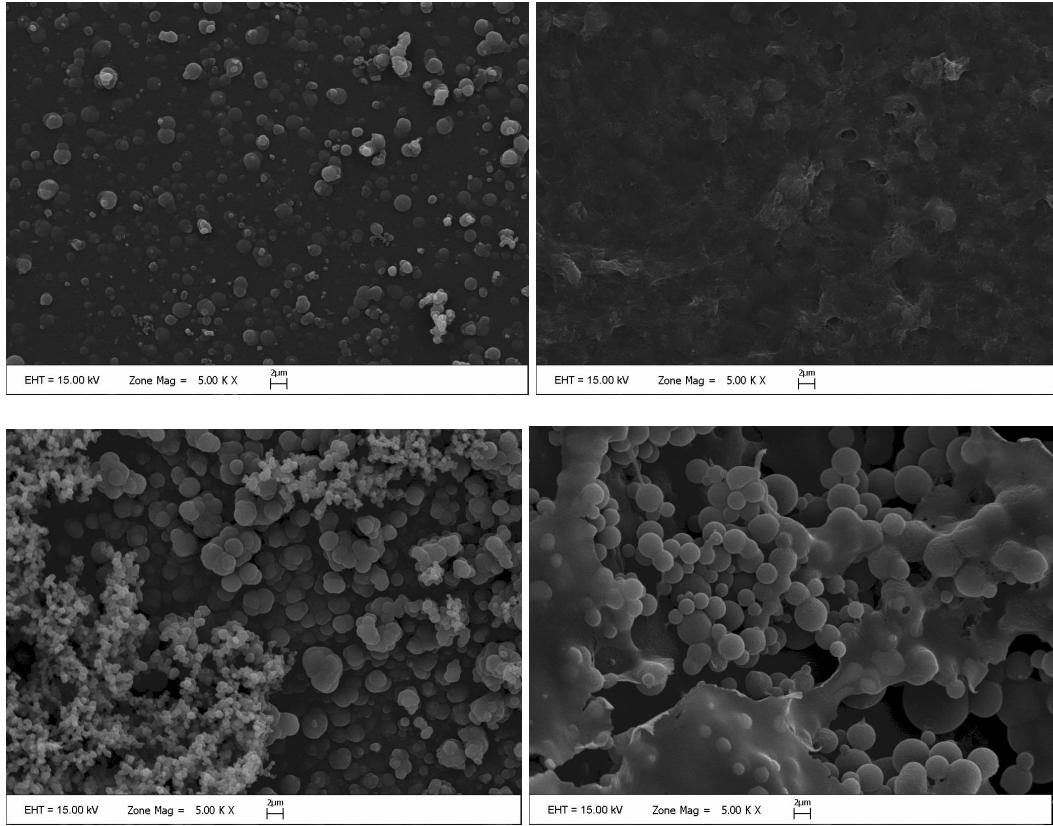


Şekil 8.4. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT elektrodun H_2O_2 ile elde edilen kalibrasyon grafiği (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, 0,70 V, oda sıcaklığı)

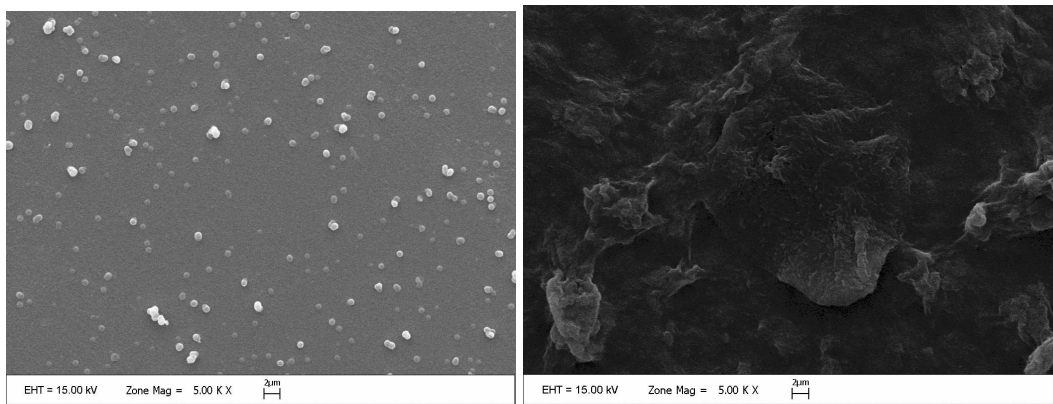


Şekil 8.5. Pt/P(SNS-An -ko- EDOT)/CNT/GOX biyosensör ile ard arda kullanılabilirlik grafiği (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,70 V, 0,5 mM glikoz, oda sıcaklığı)

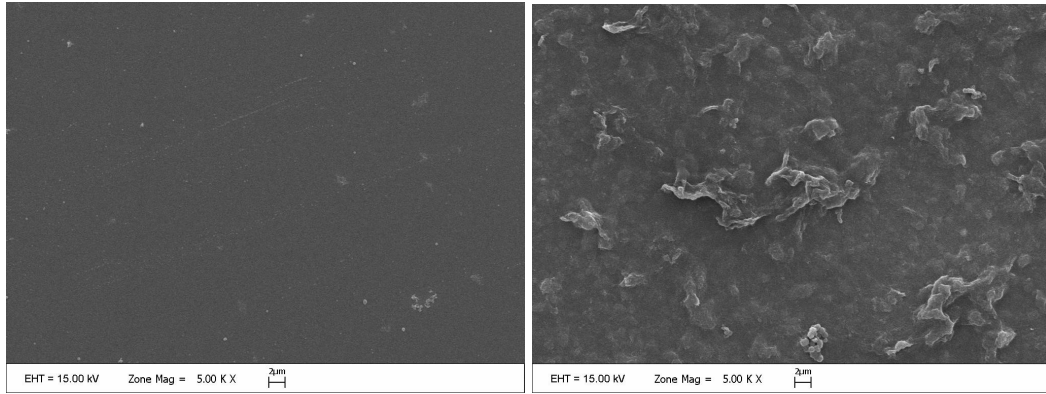
8.3.SEM Görüntüleri



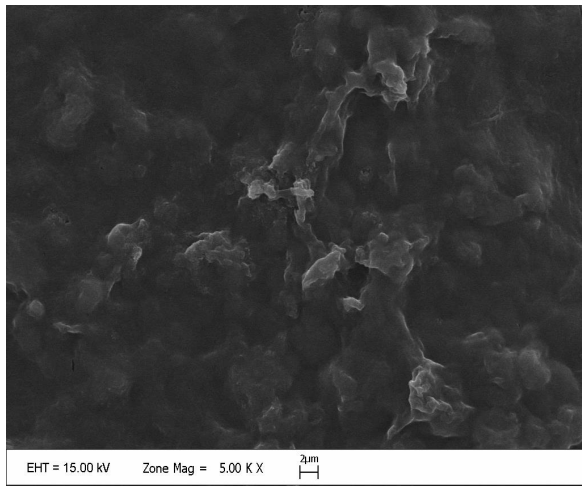
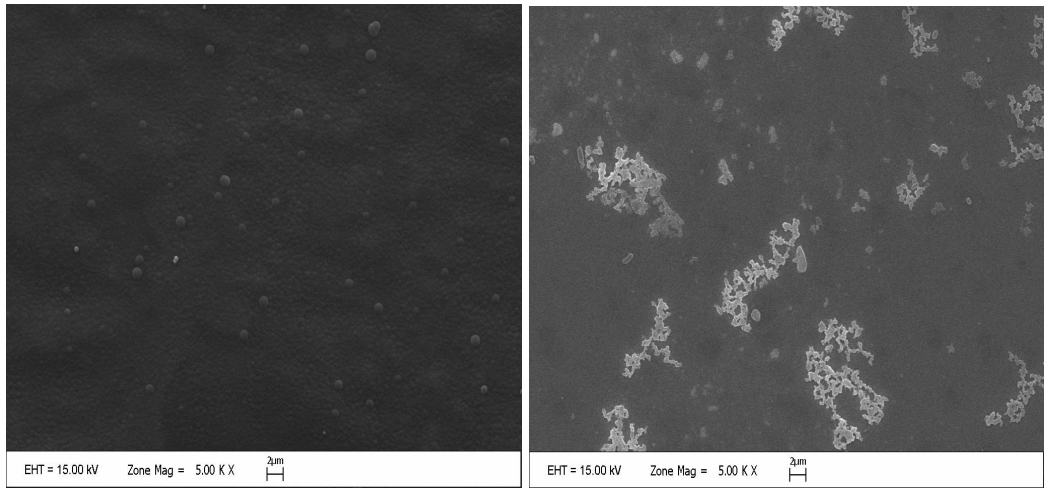
Şekil 8.6. a P(SNS-An), **b** P(SNS-An)/CNT/GOX, **c** P(SNS-An –ko- EDOT) ve **d** P(SNS-An –ko- EDOT)/CNT/GOX elektroduna ait SEM görüntüleri



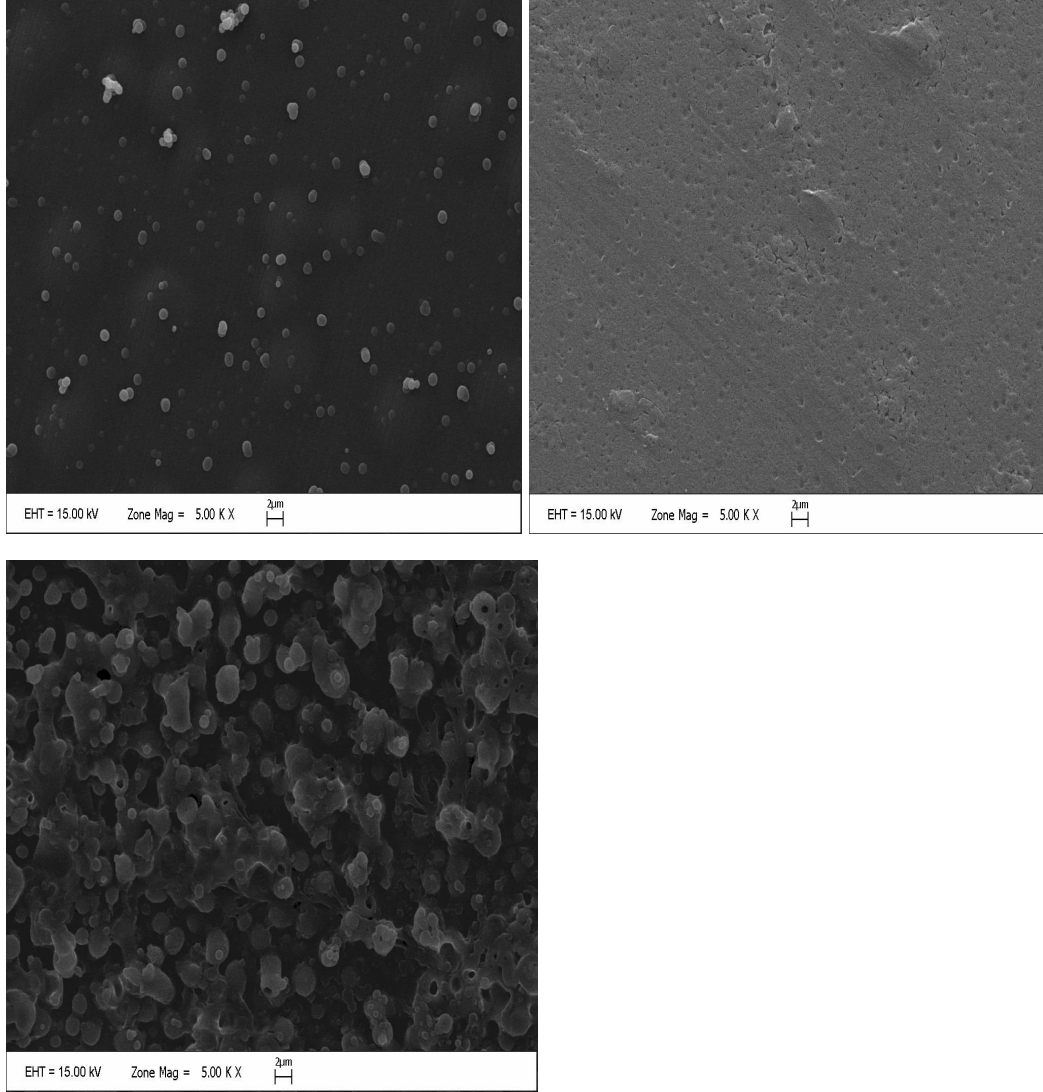
Şekil 8.7. a P(SNS-Et) ve **b** P(SNS-Et)/CNT/GOX elektroduna ait SEM görüntüleri



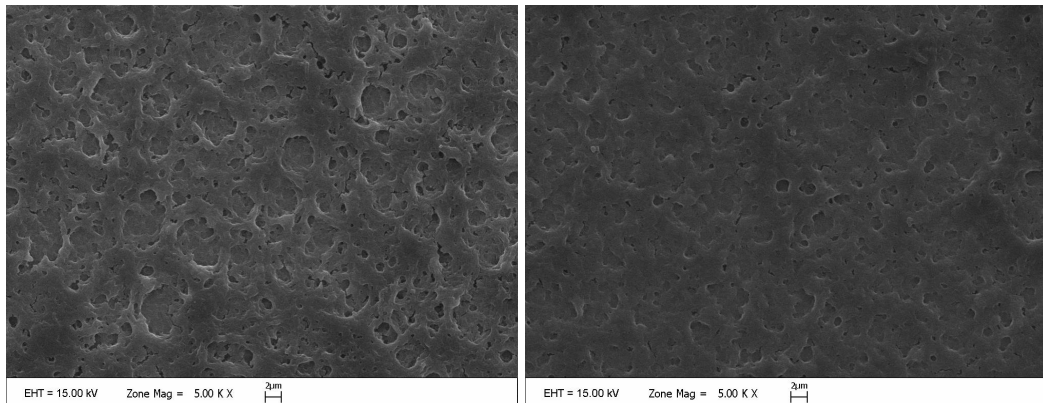
Şekil 8.8. a) P(SNS-HE) ve b) P(SNS-HE)/CNT/GOX elektroduna ait SEM görüntüleri



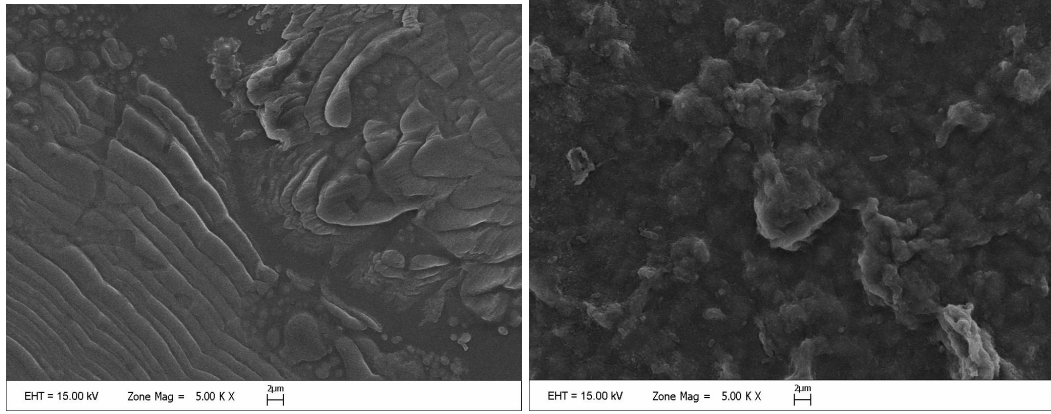
Şekil 8.9. a) P(SNS-Fc), b) P(SNS-Fc)/GOX c) P(SNS-Fc)/CNT/GOX filmlerin SEM görüntüleri



Şekil 8.10. a) P(SNS-Fc -ko- EDOT), b) P(SNS-Fc -ko- EDOT)/GOX ve c) P(SNS-Fc -co- EDOT)/CNT/GOX filmlerin SEM görüntüleri



Şekil 8.11. a) Pt/P(SNS-Fc)/CNT/Üreaz ve b) Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/Üreaz biyosensörlerinin SEM görüntüleri



Şekil 8.12. a) Pt/P(SNS-Fc)/CNT/PPO ve b) Pt/P(SNS-Fc -ko- EDOT)/CNT/PPO biyosensörlerin SEM görüntüleri

ÖZGEÇMİŞ

AYHAN ALTUN

E-mail: ayhanaltun49@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2011-2019	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Antalya
Yüksek Lisans 2004-2007	Heinrich Heine Üniversitesi Fen ve Matematik Fakültesi, Kimya Bölümü, Düsseldorf/Almanya
Lisans 1997-2001	Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Konya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2011- 2016	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Antalya
Araştırma Görevlisi 2010-2011	Muş Alparslan Üniversitesi Fen-Eddebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Muş
2009	Yurtçim Fabrikasında Üretim Mühendisi, Muş
2001-2002	MEB ücretli öğretmen, Muş