

**GLUKOZ TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYONSENSÖR
HAZIRLANMASI**

SELVİN USTABAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Haziran 2010

ANKARA

Selvin USTABAŞ tarafından hazırlanan GLUKOZ TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Fatma ARSLAN

.....

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

.....

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Fatma ARSLAN

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih:25/06/2010

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Selvin USTABAŞ

GLUKOZ TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Selvin USTABAŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAZİRAN 2010

ÖZET

Bu çalışmada, glukoz tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Glukoz oksidaz enzimi, anilinin polivinilsülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesiyle hazırlanan polianilin-polivinilsülfonat film içine hapsetme yöntemiyle immobilize edildi. Bu amaçla önce polianilin-polivinilsülfonat filminin optimum çalışma şartları belirlendi. Glukoz tayini, hazırlanan enzim elektrodun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin 0,40 V' da yükseltgenmesine dayanarak yapıldı. Biyosensörün glukoz tayini için çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M olarak tayin edildi. Glukoz biyosensörünün cevabına pH' nın ve sıcaklığın etkisi incelendi. Immobilize edilen glukoz oksidazın $K_{M(göz)}$ ve $V_{maks(göz)}$ değerleri 0,186 mM - 1,121mM olarak hesaplandı. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edildi. 16 ölçüm sonra $1,0 \times 10^{-5}$ M glukoz için, bağıl standart sapma %12,36 olarak bulundu. Hazırlanan biyosensörle biyolojik sıvıda (kan) glukoz tayini yapıldı. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

Bilim Kodu : 201.1.020
Anahtar Kelimeler :Glukoz, glukoz oksidaz, biyosensör, biyolojik sıvı,
polianilin, polivinilsülfonat, immobilize enzim
Sayfa adedi : 72
Tez yöneticisi : Doç. Dr. Fatma ARSLAN

**PREPARING A NEW BIOSENSOR FOR GLUCOSE DETERMINATION
(M. Sc. Thesis)**

Selvin USTABAŞ

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
JUNE 2010**

ABSTRACT

In this study, new amperometric biosensor for determination of glucose oxidase was developed. Glucose oxidase enzyme has been immobilized at media prepared with polyvinylsulphonate of aniline in polyaniline-polyvinylsulphonate film via the entrapment method. For this reason; optimum conditions of Pt/ polyaniline-polyvinylsulphonate electrode were determined. Glucose detection is based on the oxidation of hydrogen peroxide at 0,40 V produced by the enzymatic reaction on the enzyme electrode surface. The linear working range of biosensor for glucose was determined at $1,0 \times 10^{-7}$ M - $1,0 \times 10^{-5}$ M . The effects of pH and temperature on the response of the glucose biosensor were investigated. The immobilized of glucose oxidase $K_{M(app.)}$ and $V_{max(app.)}$ values were found as 0,186 mM and 0,121 mM . Reuse number and storage stability were determined of the biosensor. Relative Standard deviation for $1,0 \times 10^{-5}$ M glucose were %12,36 after 16 measurement. Determination of glucose was carried out in biological fluid (in blood) by biosensor. Interference effects were investigated on the amperometric response of the biosensor.

Science Code : 201.1.020
Key Words :Glucose, glucose oxidase, biosensor, biological fluid, polyaniline, polyvinylsulphonate, enzyme
Page Number : 72
Adviser : Assoc. Prof. Dr. Fatma ARSLAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince benden bilimsel ve manevi desteğini hiç esirgemeyen, her türlü imkanı bana sağlayan saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Fatma ARSLAN'a gösterdiği sabır ve iyi niyet için öncelikle teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca bilgisi ve tecrübesi ile desteğini esirgemeyen çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Ahmet YAŞAR'a ; hiçbir yardımı benden esirgemeyen sadece tez değil her konuda çok büyük destek gördüğüm sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Halit ARSLAN'a ; bana her konuda yardımcı olan aynı zamanda manevi açıdan beni hep destekleyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Servet ÇETE'ye sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni maddi manevi destekleyen ve sürekli arkamda güçlerini hissettiğim, benim bu noktaya gelmemde büyük pay sahibi olan annem Ayten USTABAŞ'a ve babam Asım USTABAŞ'a; her zaman yanımda olup bana destek olduğu için kardeşim Pelin USTABAŞ'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Enzimler.....	4
2.2. Glukoz Oksidaz Enziminin Özellikleri ve Glukoz Tayininin Önemi	4
2.3. Biyosensörler	6
2.3.1. Biyosensörlerin yapısı ve fonksiyonu.....	7
2.3.2. Biyobileşenler	8
2.3.3. Dönüştürücüler	9
2.3.4. Biyosensörlerin uygulama alanları.....	9
2.4. İletken Polimerlerle Dönüştürücü Hazırlanması	10
2.4.1. İletken polimerler	10
2.4.2. Elektrokimyasal polimerizasyon	11
2.4.3. Elektrokimyasal polimerleşme mekanizması	12
2.4.4. İletken polimerlerle enzim immobilizasyonu	13
2.5. Biyobileşen Immobilizasyonu	15
2.5.1. Kovalent bağlama	16

	Sayfa
2.5.2. Tutuklama.....	16
2.5.3. Çapraz bağlama	17
2.5.4. Adsorbsiyon.....	17
2.6. Enzim Sensörleri.....	18
2.6.1. Enzim sensörlerinin genel çalışma ilkesi	19
2.6.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	20
2.7. Performans Faktörleri	21
2.7.1. Seçicilik	21
2.7.2. Kullanım ömrü	21
2.7.3. Kalibrasyon gereksinmesi.....	21
2.7.4. Tekrarlanabilirlik	21
2.7.5. Kararlılık	22
2.7.6. Yüksek duyarlılık	22
2.7.7. Yeterli düzeyde tayin sınırı	22
2.7.8. Geniş ölçüm aralığı.....	22
2.7.9. Hızlı cevap zamanı	23
2.7.10. Basitlik ve ucuzluk	23
2.8. Kaynak Araştırması.....	23
3. DENEYSEL KISIM	31
3.1. Cihazlar Ve Malzemeler	31
3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	31
3.1.2. Hücre ve elektrotlar	31
3.1.3. pH metre.....	31

	Sayfa
3.1.4. Su banyosu	32
3.1.5. Mikro pipet.....	32
3.1.6. Argon gazı	32
3.1.7. Saf su	32
3.1.8. SEM analizi	32
3.2. Kullanılan Reaktifler Ve Özellikleri	32
3.2.1. Kullanılan çözeltiler.....	33
3.3. Platin Yüzeye Polianilin-polivinilsülfonat Kaplanması	35
3.4. Pt/PANI-PVS Elektrot İçin En İyi Çalışma Koşullarının Araştırılması ..	36
3.4.1. Polianilin-polivinilsülfonat filmin elde edilme potansiyeli	36
3.4.2. Anilin derişiminin etkisi	36
3.4.3. Film kalınlığının etkisi	37
3.4.4. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi.....	37
3.4.5. pH'nın etkisi	37
3.5. Platin/polianilin-polivinilsülfonat Elektrodu Kullanılarak Serbest Enzim İle Hücrede Oluşan Hidrojen Peroksidin Ölçülmesi	38
3.6. Enzim Elektrodunun Hazırlanması.....	38
3.7. Enzim Elektrodunun Glukoza Duyarlılığının Belirlenmesi	38
3.8. Enzim Elektrodunun En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	39
3.8.1. pH'nın etkisi	39
3.8.2. Sıcaklığın etkisi	40
3.8.3. Substrat derişiminin etkisi.....	40
3.8.4. Enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi.....	40
3.8.5. Enzim elektrodunun raf ömrünün belirlenmesi	41

	Sayfa
3.8.6. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler	41
3.8.7. Biyolojik sıvıda (kanda) glukoz tayini	43
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	45
4.1. Pt/PANI-PVS Elektrot İçin En İyi Çalışma Koşullarının Araştırılması .	46
4.1.1. Polianilin-polivinilsülfonat filmin elde edilme potansiyeli	46
4.1.2. Anilin derişiminin etkisi	47
4.1.3. Film kalınlığının etkisi	49
4.1.4. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi.....	50
4.1.5. pH'nın etkisi	52
4.2. Serbest Enzim Çalışması	53
4.2.1. Substrat derişiminin etkisi.....	53
4.3. Enzim Biyosensörünün Hazırlanması	54
4.4. Glukoz Biyosensörünün En İyi Çalışma Koşulları	55
4.4.1. pH etkisi.....	55
4.4.2. Sıcaklığın etkisi	56
4.4.3. Substrat derişiminin etkisi.....	57
4.4.4. Enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği.....	60
4.4.5. Raf ömrünün belirlenmesi.....	61
4.4.6. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler	63
4.4.7. Biyolojik sıvıda (kanda) glukoz tayini	64
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	72

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi	8
Çizelge 2.2. Biyosensörler için uygulama alanları.....	9
Çizelge 2.3. İletken polimerlerin kullanıldığı glukoz biyosensörleri.....	14
Çizelge 2.4. İletken polimerlerin kullanıldığı biyosensörler.....	15
Çizelge 2.5. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması.....	20
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar	33
Çizelge 4.1. Pt/Polianilin-polivinilsülfonat elektrodun hazırlanması için en iyi koşullar	53
Çizelge 4.2. Biyosensör üzerine ($1,0 \times 10^{-5}$ M glukoz derişiminde) girişim yapan maddeler ve girişim etkileri	64
Çizelge 4.3. Kan numunelerinde hesaplanan glukoz derişimleri.....	65

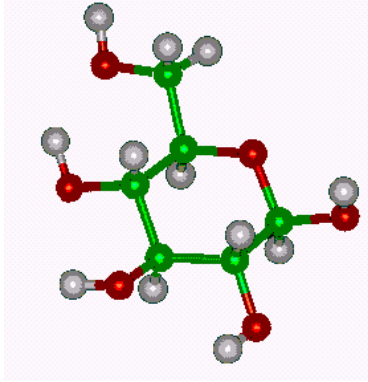
ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Glukozun yapısı	1
Şekil 2.1. Glukoz oksidazın katalizlediği reaksiyon	5
Şekil 2.2. Glukoz oksidaz enziminin yapısında bulunan FAD grubu	6
Şekil 2.3. Elektrokimyasal hücre	11
Şekil 2.4. Polianilinin oluşum mekanizması	13
Şekil 2.5. Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri	17
Şekil 2.6. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri	18
Şekil 2.7. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi	19
Şekil 3.1. Kaplama ve ölçme yapmada kullanılan hücre sistemi	31
Şekil 4.1. Glukozun glukonik aside yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı	45
Şekil 4.2. Pt/PANI-PVS filmin elde edilme potansiyeli.....	47
Şekil 4.3. Pt/PANI-PVS elektrodunun hidrojen peroksida duyarlılığına anilin derişiminin etkisi.....	48
Şekil 4.4. Pt/PANI-PVS elektrodunun hidrojen peroksida duyarlılığına film kalınlığının etkisi	50
Şekil 4.5. Pt/PANI-PVS elektrodu kullanılarak farklı potansiyellerde hidrojen peroksit derişimi ile akım arasındaki ilişkinin incelenmesi	51
Şekil 4.6. Pt/PANI-PVS elektrodunun hidrojen peroksida duyarlılığına pH' nın etkisi	52
Şekil 4.7. Serbest enzimin aktivitesi üzerine glukoz derişiminin etkisi (pH=7,5 , 25 °C)	53
Şekil 4.8. Pt/PANI-PVS-Glukoz oksidaz enzim filminin SEM fotoğrafı	54
Şekil 4.9. Pt/PANI-PVS filminin SEM fotoğrafı	55

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. Biyosensörün glukoza duyarlılığına pH'nın etkisi (0,1 M fosfat tamponu, 25 °C)	56
Şekil 4.11. Biyosensörün glukoza duyarlılığına sıcaklığın etkisi (0,1 M pH=7,5 fosfat tamponu)	57
Şekil 4.12. Biyosensörün amperometrik cevabına glukoz derişiminin etkisi (0,1 M pH=7,5 fosfat tamponu, 25 °C)	58
Şekil 4.13. Glukoz biyosensörünün kalibrasyon grafiğı (0,1 M pH=7,5 olan fosfat tamponu, 25 °C).....	59
Şekil 4.14. Biyosensörün glukoza duyarlılığını gösteren Linewear-Burke grafiğı	59
Şekil 4.15. Enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1M pH=7,5 olan fosfat tamponu, 25°C)	61
Şekil 4.16. Enzim elektrodunun raf ömrünün incelenmesi (0,1 M pH=7,5 olan fosfat tamponu, 25 °C)	62
Şekil 4.17. Glukoz biyosensörünün kalibrasyon grafiğı (0,1 M pH=7,5 olan fosfat tamponu, 25 °C).....	65

1. GİRİŞ

Glukoz ($C_6H_{12}O_6$, MA: 180,16), erime noktası 146 °C olan altı karbondan oluşmuş bir monosakkarittir. Glukoz beyin için tercih edilen enerji kaynağıyken, çok az veya hiç mitokondrisi olmayan hücrelerin örneğin olgun eritrositlerin muhtaç oldukları enerji kaynağıdır [1].



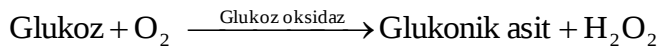
Şekil 1.1. Glukozun yapısı

Kan glukoz düzeyine glisemi adı verilir. Normal sınırlardaki glisemiye normoglisemi, normal sınırın altındaki glisemiye hipoglisemi ve normal sınırın üstündeki glisemiye ise hiperglisemi adı verilir. Kan glukoz seviyesi, glukoz metabolizması ile ilgili bütün metabolik yolların (glikoliz, glikojenoliz, glikojenez, glukoneogenez vb.) koordineli çalışması ve kontrolü ile ayarlanır. Kan glukoz seviyesinin düzenlenmesinde, karaciğer ve hormonların etkisi önemlidir. Kısa süreli açlıklarda, karaciğerdeki glikojenden glikojenoliz sonucu kana glukoz verilirken uzun süreli açlıklarda ise karaciğer tarafından glukoneogenezle kana glukoz verilir [2].

Glukoz tayin metotları kolorimetrik ve enzimatik metotlar olmak üzere iki tanedir. Kolorimetrik metotlar Folin-Wu metodu ve o-Toluidin metodu; enzimatik metotlar ise glukoz oksidaz metodu (enzimatik kolorimetrik metot) ve hekzokinaz metodudur (enzimatik ultraviyole metot) [3].

Glukoz oksidaz enziminde (EC 1.1.3.4, β -D-glukoz:oksijen oksidoredüktaz)

prostetik grup (aktif merkez) olarak FAD (flavin adenin dinükleotid) bulunur. Glukoz oksidaz enzimi glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono- δ -lakton (glukono-1,5-lakton) ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) oluştuğu reaksiyonu katalizler. Lakton sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşür [4]. Reaksiyon aşağıdaki gibidir:



Glukoz tayini gıda işlemleri ve fermantasyonda olduğu kadar klinik, biyolojik ve kimyasal örneklerde de çok önemlidir. şeker hastalığının izlenmesi ve tıbbi teşhis amacıyla glukoz tayinleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Deri altı dokularında glukoz derişimini sürekli bir değerdendirmeye tabi tutabilmek ve kandaki glukoz seviyesini belirleyebilmek amacıyla duyarlı, seçici, güvenilir ve düşük maliyetli glukoz sensörü üretimi giderek artmaktadır [5].

Literatürler incelendiğinde polianilin tabakasına glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu [6]; polianilin film üzerine çapraz bağlama yöntemi kullanılarak glukoz oksidazın immobilizasyonu [7]; polianilin-poliizopren kompozit filmi üzerine elektrokimyasal yöntemle hapsetme yapılarak [8]; ITO cam elektrodunun kullanıldığı polianilin-polivinilsülfonat kompozit filmi üzerine potansiyometrik metot kullanılarak [9] ; çapraz bağlı olarak glutraldehit ile bambu iç kabuk membranı üzerine glukoz oksidazın immobilizasyonu [10]; platin elektrotta p-klorofenolün elektrokimyasal polimerizasyonu ile glukoz oksidazın immobilizasyonu [11] gibi amperometrik, potansiyometrik, florimetrik yöntemler kullanılarak glukoz duyarlı biyosensörler hazırlanmıştır.

Çalışmamızda glukoz duyarlı yeni bir amperometrik biyosensör hazırlandı. Bunun için platin/polianilin-polivinilsülfonat (Pt/PANI-PVS) elektrodu anilinin elektropolimerleşmesiyle hazırlandı. Hazırlanan bu elektrodun en iyi çalışma koşulları araştırıldı. Daha sonra elektrot yüzeyindeki polianilin-polivinilsülfonat

filme glukoz oksidaz enzimi hapsetme yöntemiyle immobilize edildi. Glukoz tayini enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin 0,40 V' da yükseltgenmesi esasına dayanılarak yapıldı. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşulları belirlendi ve performansını etkileyen faktörler incelendi. Daha sonra biyolojik sıvılardaki olabilecek muhtemel girişimler incelendi ve hazırlanan enzim elektrotla kanda glukoz tayini yapıldı.

Bu çalışma Pt/PANI-PVS elektrodunun hazırlama koşulları; immobilizasyon tekniği ve tayin yöntemi açısından diğer çalışmalardan farklıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler, canlı için yaşamsal önemi olan pek çok fonksiyonun kontrolünde rol alan, bir yandan da organizmada hemen hemen bütün kimyasal tepkimelere katılarak, oluşumlarını inanılmaz boyutlarda hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Çok defa renksizdirler, bazen sarı, yeşil, mavi, kahverengi ya da kırmızı olabilirler. Suda ya da tuz çözeltisinde çözülebilirler. Her enzim bir biyokatalizördür. Başka bir deyişle, enerji açısından normal koşullarda hiç gerçekleşemeyecek ya da çok yavaş gerçekleşebilecek kimyasal tepkimelere katılarak, kendileri bir değişikliğe uğramadan, bu tepkimelerin çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Kuramsal olarak bir enzim belli bir tepkimeye girip bir değişikliğe uğramadan çöktüğü için, sürekli olarak aynı türden tepkimelere katılabilmelidir. Ancak gerçekte durum böyle değildir, çünkü enzimlerin de bir ömrü vardır [12].

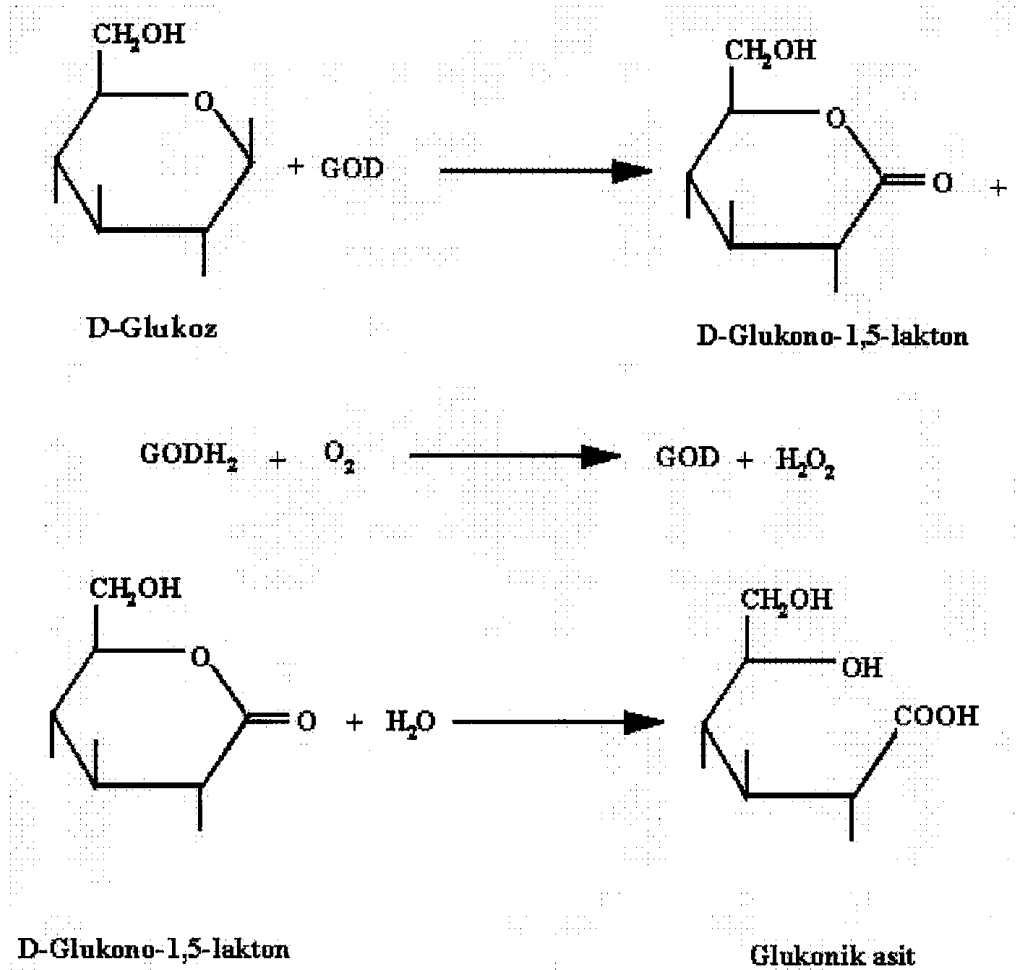
İnsanlar gerçekte binlerce yıl öncesinden bu yana enzimlerden yararlanmışlardır. Örneğin; alkol fermantasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi işlemler ilk biyoteknolojik çalışmalar olarak tanımlanabilir. Buna karşılık enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak geçtiğimiz yüzyılda görülmeye başlanmıştır. 1783 yılında Spallanzani'nin atmaca mide suyunun eti çözebileceğini bulması, 1811 yılında Kirchoff'un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve diğer bileşiklerine dönüştüğünü belirlemesi enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir [13].

2.2. Glukoz Oksidaz Enziminin Özellikleri Ve Glukoz Tayininin Önemi

Glukoz oksidaz (GOD) enziminin aktivitesi ilk defa 1904 de Maksimow tarafından *Aspergillus Niger*'de saptanmıştır. Enzimin oksidatif etkisi olduğunu belirleyen Müller (1928), saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik gruptan (flavin adenin dinükleotid, FAD)

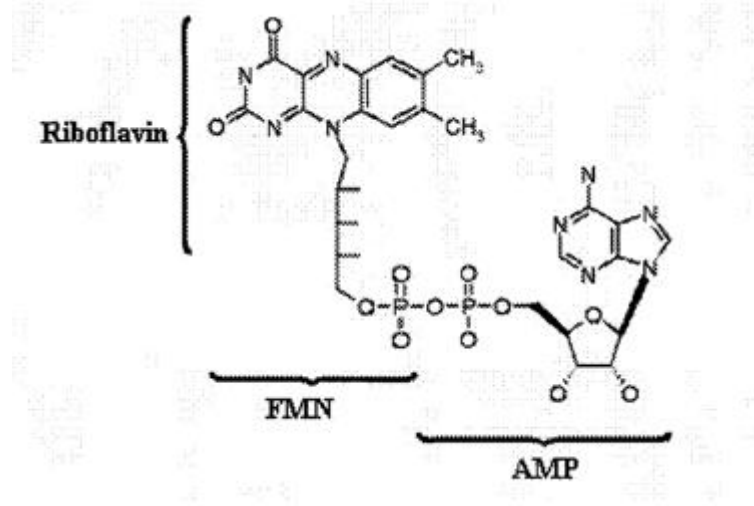
kaynaklandığını öne sürmüştür. Keilin ve Hartree (1948) oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı H_2O_2 ile antimikrobiyal aktivite gösterip antibiyotik olarak davrandığını belirlemişlerdir [14].

GOD'nin glukozu glukonik aside oksitlediği reaksiyon Şekil 2.1'de görülmektedir. Reaksiyon flavoenzimin önce indirgendiği ve sonra da yükseltgenmesinin meydana geldiği iki basamak üzerinden yürür. İndirgenme yarı basamağında glukoz 2 proton ve elektronu enzime aktarır glukonolaktona dönüşür. Yükseltgenme yarı basamağında ise enzim moleküler oksijen ile yükseltgenir ve hidrojen peroksit oluşur [15].



Şekil 2.1. Glukoz oksidazın katalizlediği reaksiyon

Şekil 2.1.'de verilen tepkime Glukoz oksidaz enziminin bünyesinde bulunan FAD grubu üzerinden yürümektedir. Şekil 2.2' de FAD molekülünün kimyasal yapısı verilmiştir [14].

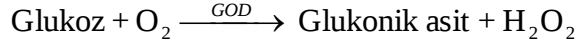


Şekil 2.2. GOD enziminin yapısında bulunan FAD grubu

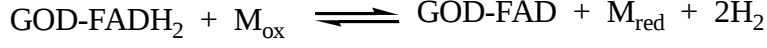
FAD'nin indirgenme özelliği riboflavin molekülünün indirgenmesi esasına dayanır. FAD elektron akseptörü olarak davranarak glukozu yükseltger; ardından moleküler oksijeni indirgeyerek hidrojen perokside dönüştürür ve kendisi tekrar oksitlenmiş formuna dönüşür [14].

2.3.Biyosensörler

Biyosensörler; biyoloji, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanılarak biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesi sonucu geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanabilir [16]. Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarında L. C. Clark'ın kandaki glukoz seviyesini ölçmesiyle başladı. Clark ve Lyons'un geliştirdiği biyosensörlerde elektron alıcı olarak oksijen kullanılırken, daha sonraki çalışmalarda elektron alıcı olarak redoks mediyatörleri kullanılmaya başlanmıştır [17].



GOD = Glukoz oksidaz



$\text{M}_{\text{red}} = \text{M}_{\text{ox}}$ = redoks medyatörü

Üçüncü nesil biyosensörlerde enzimin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında direkt elektriksel iletişim sağlanmış ve redoks mediyatörlerine gereksinim kalmamıştır [17].

Biyosensörlerde biyobileşen olarak enzimler yanında doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikörler ve nükleik asitler de kullanılabilmekte olup ölçüm tekniğine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik, optik sensörler olarak adlandırılmaktadırlar [17]. Biyosensörlerin yüksek spesifiklik yanında; renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında ölçüme olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır. Fakat reseptör olarak adlandırılan biyobileşenlerin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü kısalttığından bir dezavantajdır [17].

2.3.1. Biyosensörlerin yapısı ve fonksiyonu

Biyosensörler biyobileşenler (reseptör) ile fiziksel bileşenlerden (transduser) oluşurlar. Biyosensörün çalışma prensibi Çizelge 2.1'de şematize edilmiştir [18].

Çizelge 2.1. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi

Numune	Biyobileşenler Enzimler Doku kesitleri Organeller Immuno ajanlar Nükleik asitler Mikroorganizmalar	Dönüştürücüler Elektrokimyasal yöntemler Potansiyometrik Amperometrik Konduktometrik Alan etkili transistörler Piezoelektrik Kütle değişimi Termistörler Isı değişimi Optik Fotometri Florimetri Luminesans	Sinyal Güçlendirici	Veri toplama ve değerlendirme
--------	--	--	---------------------	-------------------------------

2.3.2. Biyobileşenler

Biyosensörlerin yapısında görev alan biyobileşenler çoğu kez biyoreseptör olarak da adlandırılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır [17].

Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar ve nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler, sensörlerde biyobileşen (biyoreseptör) olarak kullanılırlar. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratırlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler transduser tarafından algılanır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok sayıda maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri ve tercihen mikroorganizmalar kullanılır. Mikroorganizmalar değişik reseptör davranışları gösterirler ve biyolojik oksijen gereksinimi (BOD), toksisite ve mutajenite testlerinde başarı ile kullanılmaktadırlar [17].

2.3.3. Dönüştürücüler (Transduserler)

Transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyona göre transduser seçilir. Elektrodlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır ve burada hedef; analitdir. (O^{2-} elektrodunda çözünmüş O_2 , pH elektrodunda H^+ iyonu gibi). Optik sensörlerde hedef; ışık, piezoelektrik sensörlerde ise kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi sebebiyle değişmesidir [17].

2.3.4. Biyosensörlerin uygulama alanları

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tesbiti ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180'den fazla farklı madde için sensör hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir. Biyosensörler için mümkün uygulama alanları Çizelge 2.2' de gösterilmiştir [17].

Çizelge 2.2. Biyosensörler için uygulama alanları

Klinik teşhis, biyomedikal sektör

Proses kontrolü

Biyoreaktör kontrolü

Gıda üretim ve analizi

Tarım ve veterinerlik

Bakteri ve virüs teşhisinde

İlaç analizi

Endüstriyel atık su kontrolü

Çevre koruma ve kirlilik kontrolü

Maden işletmelerinde zehirli gaz analizleri

Askeri uygulamalar

Hiç kuşkusuz biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Bu alanda uygulama olanağı bulan ilk biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glukoz oksidaz elektrodudur [17].

Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glukoz olmak üzere birçok monosakkarit, amino asitler, organik asitler (laktik asit) üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca gıdalardaki yabancı maddeler (pestisidler, toksinler ve yabancı hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks parametreler için de biyosensörler hazırlanabilir [17].

İlaçların kötü amaçla kullanımı ve uyuşturucu ile mücadelede biyosensörler kullanılabilecektir. Uyuşturucu arayan köpeklerin yerini biyosensörler alabilir. Böylece özellikle gümrüklerde, karakollarda zaman kazanılacaktır. Toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır [17].

2.4. İletken Polimerlerle Dönüştürücü Hazırlanması

2.4.1. İletken polimerler

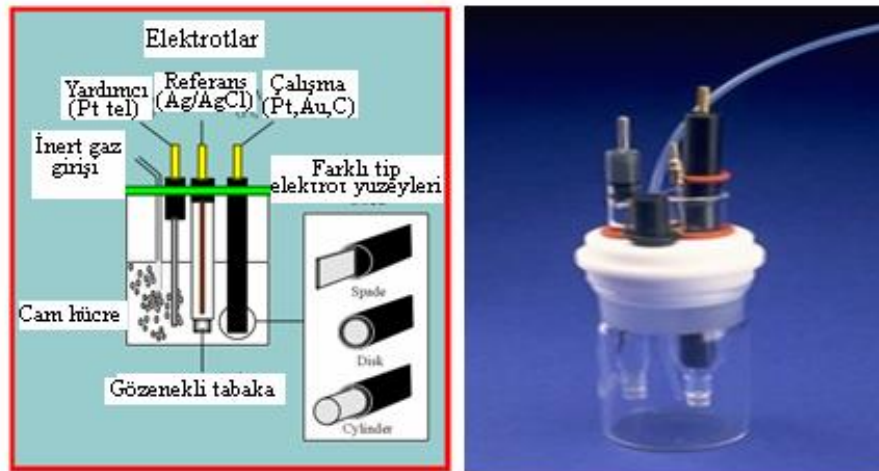
Polimerler, ilk bulunuşlarından bu yana genelde yalıtkan malzeme olarak kullanılmışlardır. İlk iletken polimer 1977 yılında Shirakawa ve arkadaşları tarafından sentezlendikten sonra, 1990 yılına kadar yapılan çalışmalar, çözünabilir, kararlı ve iletken polimerlerin sentezi üzerine olmuştur.

Elektrolüminesans konjuge polimerler ilk olarak 1990 yılında sentezlendikten sonra, polifenilenvinilen kullanılarak polimerik bazlı ışık yayma diyotu (PLED) hazırlanmıştır. Bunu takiben organik boya sensörlü ilk güneş pili 1991 yılında (O'Reagen ve Gratzel, 1991) ve ilk polimerik güneş pili ise çift tabakalı olarak 1992 yılında üretilmiştir [19].

İletken polimerler hem kimyasal yolla hem de elektrokimyasal yolla sentezlenebilmektedir. Elektrokimyasal sentezin, film üzerine direkt polimerizasyon ve daha saf polimer eldesi gibi birçok bakımdan kimyasal senteze göre üstünlüklerinin bulunmasına karşın, elektrokimyasal yolla hazırlanan polimerin molekül ağırlığını ve heterojenlik indeksini kontrol etmek zordur.

2.4.2. Elektrokimyasal polimerizasyon

Elektrokimyasal polimerizasyon, genellikle elektrot yüzeyinde elektroaktif polimer filmleri hazırlanarak yapılır. Bu yöntemde; kullanılan hücre içinde üçlü elektrot (çalışma, referans ve yardımcı elektrotlar) sistemi, monomer çözeltisi ve elektrolit bulunur [20].



Şekil 2.3. Elektrokimyasal hücre

Elektroindirgenme yönteminin en büyük dezavantajı, polimerin yalıtkan formunda elde edilmesidir ki bu durum, elektrodun pasifleşmesine yol açar ve polimer filminin elektrot yüzeyinde birikerek kalınlaşmasını sınırlar.

Elektroyükseltgenme ile sentezlenmiş polimerler, genellikle, kimyasal veya elektroindirgenme yolu ile sentezlenmiş polimerlere göre daha iyi özellikler

gösterirler. Yükseltgenme elektropolimerizasyonu yönteminin avantajları sıralanacak olursa:

1)Yüksek elektroaktifliğe sahip iletken polimerler, bir elektrot yüzeyinde kolayca oluşturulabilir.

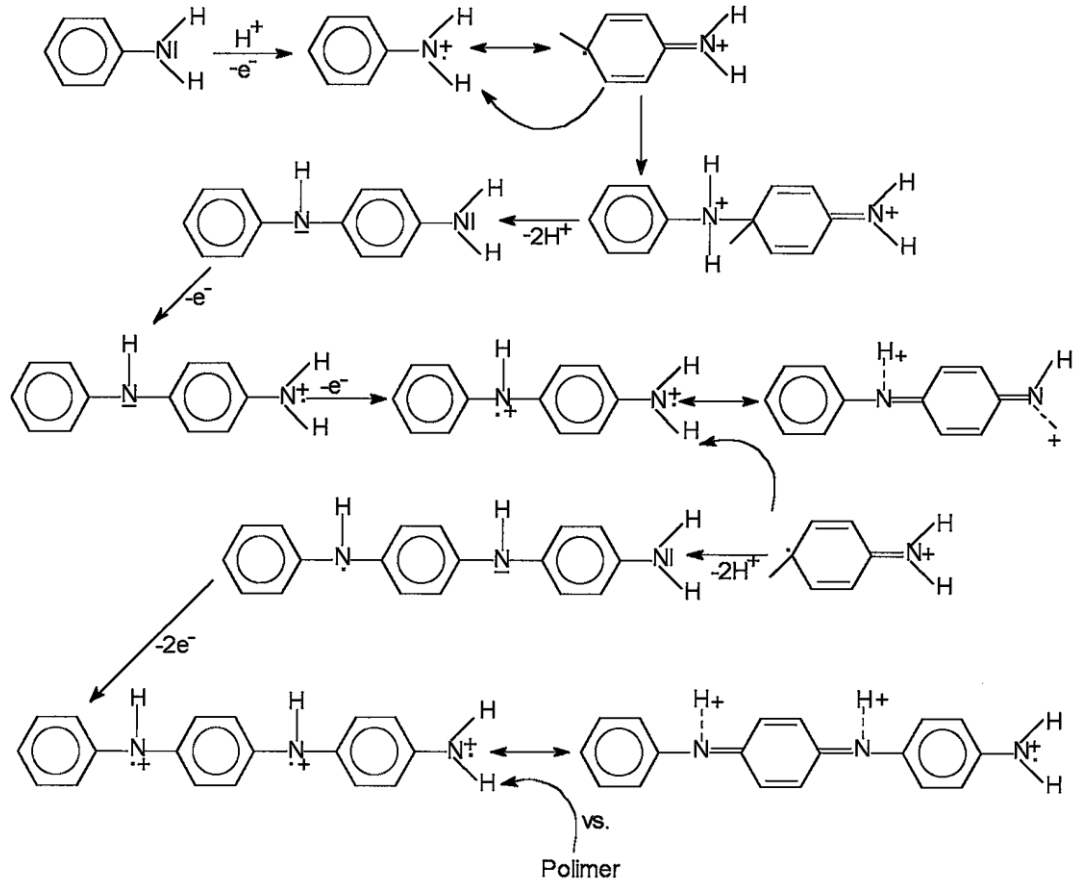
2)Uygulanan potansiyel, polimerleşme zamanı ve tarama hızı yardımıyla, film kalınlığı, morfolojisi ve iletkenliği kolayca kontrol edilebilir.

3)Polimerizasyon yönteminin ve elektrokimyasal/spektroskopik tekniklerle, iletken polimerlerin özelliklerinin incelenmesine olanak sağlar [20].

2.4.3. Elektrokimyasal polimerleşme mekanizması

Polianilinin sentezinde kullanılan birçok yöntem, değişik özellikte ve yapıda ürünler vermektedir. Genellikle polimerizasyon işleminde monomerin radikal bir katyonu, bir diğer radikal katyon ile iki proton ayrılması sonucu bir dimer oluşturmaktadır. Monomerin yükseltgenmesi için gerekli olan voltajda, ortamda bulunan dimer ya da oligomerler de yükseltgenir ve bunlar, anilin zinciri oluşturmak üzere daha sonra monomerin radikal katyonu ile tepkimeye girerler. Genies ve Ark. (1985) ve Syed ve Sinesan (1991) 'in bildirdiğine göre Mohilner ve Ark. (1962); Bretienbach ve Heckner (1971); Hand ve Nelson (1974), anilinin elektropolimerizasyonu için mekanizma önermişlerdir. Önerilen mekanizmalardaki ortak radikal Şekil 2.4' de görüldüğü gibi, üç farklı rezonans formu verir. Bretienbach ve Heckner (1971), tarafından asidik ve bazik ortamda anilinin anodik yükseltgenmesi için iki mekanizma rapor edilmiştir. Mohilner ve Ark. (1962), asidik ortamda önerilen mekanizmanın, başlangıçtaki yük transfer adımı için kinetik parametrelerin ölçülmesine ve anot üzerinde oluşan çökeleğin infrared çalışmalarındaki özellikleriyle direkt olarak karşılaştırılmasına dayandığını açıklamışlardır. Elde ettikleri deneysel bulgular ışığında, anilinin elektrokimyasal yükseltgenmesinde p-aminodifenilaminin bir ara ürün olarak oluştuğunu önermişlerdir. Onlar, p-aminodifenilaminin elektrokimyasal yükseltgenmesinin anilinden daha kolay

olduğunu göstermişlerdir. Asetonitril-piridin gibi bazik bir ortamda anilinin polimerizasyon mekanizması, daha önce asidik ortamda önerilen mekanizmaya oldukça benzemektedir. Polianilinin oluşum mekanizması Şekil 2.4’de verilmiştir [21].



Şekil 2.4. Polianilinin oluşum mekanizması

2.4.4. İletken polimerlerle enzim immobilizasyonu

İletken polimerler elektrodların elektroanalitik uygulamalarında, enzim immobilizasyonuna sıklıkla rastlanılmaktadır. Çizelge 2.3 ve 2.4’de görüldüğü gibi enzim kullanılan biyosensörlerin geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır. Aizawa ve Foulds tarafından yapılan öncü çalışmaların ardından enzimler çeşitli iletken polimerlerle immobilize edildi. Elektroliz çözeltisinde monomerlerle birlikte enzimin yer aldığı polimerizasyon yöntemi dışında bazı

teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim molekülüne monomer kimyasal olarak bağlanabilmekte ve ardından iletken polimer elektrolizle üretilmektedir. Bu yöntem ile kovalent bağlı enzim elektrot elde edilmektedir [22].

Çizelge 2.3. İletken polimerlerin kullanıldığı glukoz biyosensörleri

Enzim	Polimer	Tayin yöntemi
Glukoz oksidaz	Polipirol	Amperometri
	Poli(N-Metilpirol)	Potansiyometri
	Polianilin	Amperometri
	Poli(o-fenilendiamin)	Amperometri
	Poliindol	Amperometri
Glukoz oksidaz ve peroksidaz	Polipirol	Amperometri
Glukoz oksidaz ve katalaz	Polipirol	Amperometri
Glukoz dehidrojenaz	Polipirol	Amperometri

Çizelge 2.4. İletken polimerlerin kullanıldığı biyosensörler

Substrat	Enzim	Polimer	Tayin yöntemi
D-Alanin	D-Aminoasit oksidaz	Polipirol	Amperometri
Atrazin	Tirosinaz	Polipirol	Amperometri
Kolesterol	Kolesterol oksidaz	PPD	Amperometri
	Kolesterol oksidaz ve Kolesterol esteraz	Polipirol	Amperometri
Kolin	Kolin oksidaz	Polipirol	Amperometri
Dopamin	Tirosinaz	Polipirol	
Katekolamin			
Galaktoz	Galaktoz oksidaz	Polianilin	Amperometri
Glutamat	Glutamat	Polipirol	Amperometri
	Dehidrojenaz	Polipirol	Amperometri
Fruktoz	Fruktoz dehidrojenaz	Polianilin	Kondüktometri
Hemoglobin	Pepsin	Polipirol	Amperometri
Hidrojen peroksit	Peroksidaz	Polianilin	
		PPD	Amperometri
L-Laktat	Laktat oksidaz	Polianilin	Kondüktometri
Lipitler	Lipaz	Polipirol	Amperometri
NADH	NADH dehidrojenaz	Polipirol	Amperometri
Fenoller	Tirosinaz	Polipirol	Amperometri
Üre	Üreaz	Polianilin	Potansiyometri
			Kondüktometri
			Kondüktometri
Ürik asit	Ürikaz	Polianilin	Amperometri
Trigliseritler	Lipaz	Polianilin	Kondüktometri

PPD-Poli(o-fenilendiamin)

Birden fazla enzimin iletken polimerlere immobilize edilmesiyle de biyosensörler hazırlanabilmektedir. Laktat dehidrojenaz ve laktat oksidaz enzimlerinin poli(fenildiamin) polimerine immobilize edilmesiyle çok hassas sensörler yapılmıştır [22].

2.5. Biyobileşen İmmobilizasyonu

Biyosensörler farklı özellikteki iki elemanın (transduser ve biyoreseptör) kombinasyonu ile oluşurlar. Uygun biyoreseptör ve transduser seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemi biyoreseptör immobilizasyonu olarak tanımlanır. Bağlama

işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen transduser ve biyoreseptöre göre belirlenir [23].

2.5.1.Kovalent bağlama

Kovalent bağlı enzim sistemleri ile ilgili ilk çalışmalar Gruphofer ve Schleith tarafından 1953 yılında diazoaktiflenmiş poliamino stirene; α -amilaz, pepsin ve ribonükleazın immobilizasyonu ile başlamıştır. Kovalent bağlanma genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır [24].

Kovalent bağlama ile immobilizasyon, destek yüzeylerde uygun bir yöntemle etkin bölgeler oluşturarak enzim molekülleri ile destek yüzeyler arasında kovalent bağ oluşturur.

Kovalent bağlanma yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması, böylece her türlü akış ortamında kullanılabilirliğidir. Enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması kolaydır. Ayrıca enzim molekülü ve destek materyali birlikte genellikle ısı kararlılık gösterirler. Yöntemin dezavantajı, destek materyali ile enzim arasındaki sıkı etkileşim enzimin doğal konformasyonunu bozabilmesidir [25].

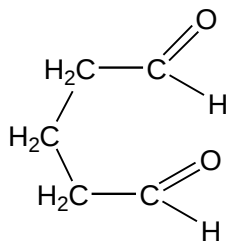
2.5.2. Tutuklama

Enzimler makromoleküler yapıları proteinler olup polimer jel matrikslerde ve daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanabilirler. Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antikorlar için de uygulanabilir. Updike ve Hicks tarafından hazırlanan ilk enzim elektrodunda glukoz oksidaz (GOD) poliakrilamid jelinde tutuklanmıştı. Guilbault ve arkadaşlarının hazırladığı üreaz elektrodunda ise üre süspansiyonu elektrot yüzeyinde diyaliz membranı tarafından sarılarak tutuklanmıştır. Çözeltide enzim aktivitesi hızla düştüğünden fiziksel tutuklama yerine kimyasal kovalent

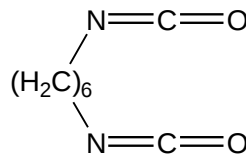
bağlama tercih edilir. Diğer bir tutuklama yönteminde elektrokimyasal polimerizasyondur [23].

2.5.3. Çapraz bağlama

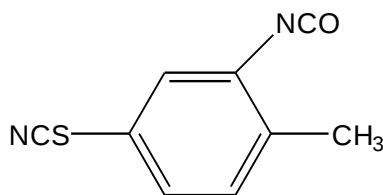
Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehit, hekzametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen sık kullanılır. Bifonksiyonel reaktifler enzimler yanında organeller, hücreler ve antijenlerin immobilizasyonunda da uygulanır. Bazı çapraz bağlayıcıların formülleri Şekil 2.5'de verilmiştir [23].



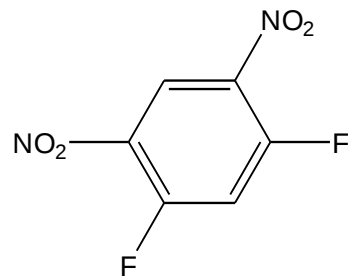
Glutaraldehit



Hekzametilen diizosiyanat



2-Izosiyanato-4-izotiyosiyanato-toluen



1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen

Şekil 2.5. Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri

2.5.4. Adsorpsiyon

Bu yöntemde biyobileşenin film veya tabakaya adsorbe olması sağlanır. Biyobileşenlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre immobilizasyon

yöntemi belirlenir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri protein yapısındaki diğer biyoreseptörler için de uygulanabilir [23].

İmmobilizasyon yöntemine göre biyosensörlerin ortalama ömürleri aşağıda verilmiştir:

Adsorpsiyon: 1 gün

Membranda tutuklama: 1 hafta

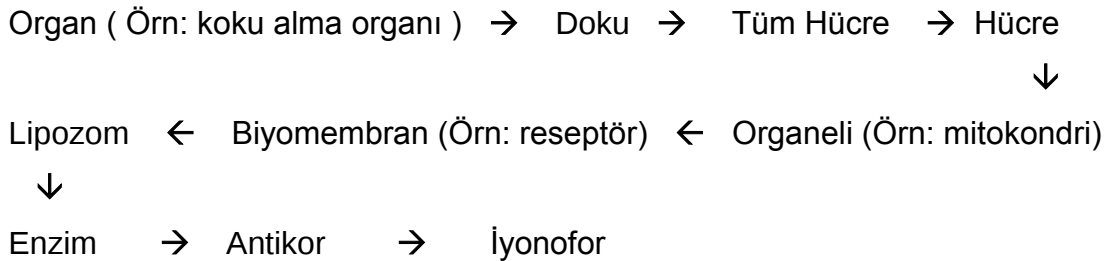
Fiziksel tutuklama: 3-4 hafta

Kovalent bağlama: 4-14 ay

2.6. Enzim Sensörleri

Kullanıldıkları reaksiyonda, yapısında bir değişim olmadan reaksiyon hızını arttıran maddelere katalizör denir. Enzimlerde bir çeşit katalizördür. Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler amperometrik ve potansiyometrik esaslı enzim elektrotlar şeklinde ortaya çıkmıştır.

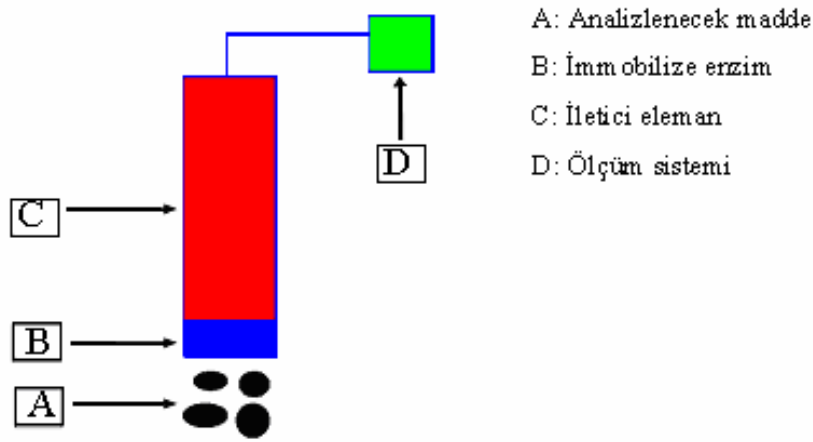
Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyolojik materyaller artan kompleksliklerine göre sıralandıklarında; iyonoforlar, antikorlar, enzimler, lipozomlar, biyomembran parçaları (örn: reseptör), hücre organelleri (örn: mitokondri), doku veya tüm hücreler ve organlar (örn: görme ve koklama organları) şeklinde sınıflandırılabilirler [26].



Şekil 2.6. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri

2.6.1. Enzim sensörlerinin genel çalışma ilkesi

En genel anlamda bakıldığında bir enzim sensörü; iletici, ince bir enzim tabakası ve ölçüm kombinasyonundan oluşmaktadır. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimler bulunmaktadır [26]. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi

Bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği tepkimeye uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletici ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan ürünün miktarındaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilmelidir. Biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka iletilici ara yüzeyindeki derişimlerin hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat derişimi sağlayabilmek için ölçme çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. İletici sistemin ölçme sistemine gönderdiği sinyal biyoaktif tabaka ile iletilici ara yüzeyindeki derişimlerdeki değişikliğe bağlıdır. Ancak söz konusu derişimler denge halinde ölçme çözeltisindeki derişimlerle orantılı olduğu için çoğu zaman kalibrasyon grafiği çizilerek sonuca varılır [18].

2.6.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması en yaygın şekilde, enzimatik reaksiyon uyarınca oluşan sinyalin ölçüm yöntemine göre yapılmaktadır. Çizelge 2.5’de bu sınıflandırma gösterilmektedir [27].

Çizelge 2.5. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

1- Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri;
Amperometrik Enzim Sensörleri;
Birincil nesil,
İkincil nesil,
Üçüncü nesil.
Potansiyometrik Enzim Sensörleri;
Proton duyar,
Amonyak duyar,
Karbondiyoksit duyar,
Diğer iyon duyar.
Yarı İletkenleri Esas Alan Enzim Sensörleri;
Enzim Alan Etki Transistörler (ENFET)
2- Optik Enzim Sensörleri;
Absorpsiyon esaslı,
Flouresans esaslı,
Biyoluminesans esaslı.
3- Kalorimetrik Enzim Sensörleri
4- Piezoelektrik Enzim Sensörleri

2.7. Performans Faktörleri

2.7.1. Seçicilik

Biyosensörün kompleks bir matriks içerisinde tek başına analitik bir ölçüm cihazı olarak kullanılabilmesini sağlar. Seçiciliğin yeterli olmadığı durumlarda çalışma prosedürüne bu eksiği giderecek ek işlemler eklenmesi gerekir. Seçiciliğin zayıf olmasından kaynaklanan sorunlar biyosensörün kullanımını zor hale getirmektedir [28].

2.7.2. Kullanım ömrü

Biyolojik çevirici olarak enzim kullanıldığı durumlarda enzim aktivitesindeki azalma kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktördür. Enzimin yaşam süresi, biyosensörün kullanım ömrü yanı sıra kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri de etkilemektedir [28].

2.7.3. Kalibrasyon gereksinmesi

İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Ama teorikte planlanan bu özellik pratikte günümüzde gerçekleştirilememiştir. Biyosensörlerin kullanım ömürleri boyunca sıkça ya da belirli aralıklarla kalibre edilerek duyarlılıklarından bir şey kaybedip kaybetmedikleri araştırılır [28].

2.7.4. Tekrarlanabilirlik

İdeal bir biyosensör elektrodunun aynı derişimde ya da aynı özelliklere sahip birden fazla örneğe daldırılmasıyla yapılan deneylerde aynı sonuçların okunması gerekir. Tekrarlanabilirlik değeri ne denli iyi olursa o biyosensör uygulaması da o denli iyi olur [28].

2.7.5. Kararlılık

Elektrot kararlılığının yüksek olduğu durumlar ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan enzimin fiziksel dayanıklılığından etkilendiği gibi; pH, ısı, nem, ortam O₂ derişimi, enzimi immobilize etmede kullanılan polimerin kimyasal ve fiziksel karakteri gibi parametrelerden de etkilenmektedir [28].

2.7.6. Yüksek duyarlılık

Hazırlanan elektroda immobilize edilmiş olan enzim; sadece belirli maddelere (substratlara) karşı duyarlı olmalıdır. Duyarlılık, akım-derişim eğrisinin eğimi ile orantılıdır. Eğim değeri büyüdükçe duyarlılıkta da artış gözlenir. Kullanılan enzimin substratları dışında biyosensörlerin girişim yapan maddelerden etkilenmemesi istenir [28].

2.7.7. Yeterli düzeyde tayin sınırı

Tasarlanan biyosensörün ideal tanımına uyması için tayin sınırının belirli bir derişim değerin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu tayin sınırı elektrot yüzeyinin büyüklüğü, enzimin tayin edilecek maddeye karşı olan afinitesi, immobilize edilen enzim miktarı, enzimin immobilizasyonunda kullanılan polimer tabakasının kalınlığı gibi faktörlerden etkilenir [28].

2.7.8. Geniş ölçüm aralığı

Ölçüm aralığı denen bölge, biyosensörden alınan akım-derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır. Tüm biyosensör uygulamalarında çalışma ortamında belirli bir derişim değerine ulaşıldıktan sonra akım-derişim eğrilerinde lineerlikten sapma gözlenmeye başlar. Bu durum enzimatik eğrilerin en önemli ve de karakteristik özelliğidir. Lineerlikten sapmanın nedeni yanıt olarak okunan akım değerlerindeki değışimin azalmasından

kaynaklanır. Bunun nedeniyse ortamda artan analizlenecek madde miktarının fazlasıyla reaksiyona girecek enzim olmamasıdır [28].

2.7.9. Hızlı cevap zamanı

Amperometrik uygulamalarda analizlenecek bir madde örneğini çalışma ortamına enjekte etmeden önce elektrot yüzeyinde oluşan akımın sabit kalması istenir. Akım sabit kaldıktan sonra analizlenecek madde ortama enjekte edilir ve akımdaki değişim kaydedilir. İkinci bir enjeksiyondan önce akım değerinin yine sabit kalması beklenir. İşte ilk enjeksiyondan sonra akımın tekrar sabit kalmasına kadar geçen zamana 'cevap zamanı' denir. Cevap zamanının kısa ya da hızlı olması ideal sensörlerin özelliklerindendir [28].

2.7.10. Basitlik ve ucuzluk

Kullanımı, tasarımı basit ve ucuz biyosensörler hazırlamak biyosensör yapımında her zaman hedef alınmış bir düşüncedir. Biyosensör yapılarının basitleştirilmesine en iyi örnek ikinci kuşak biyosensörlerin yapılarında bulunan mediyatörlerin daha gelişmiş modeller olan üçüncü kuşak biyosensörlerde ortadan kaldırılmasıdır [28].

2.8. Kaynak Araştırması

Saito ve arkadaşları 1997 yılında yaptıkları çalışmada radikal kopolimerizasyonla hazırlanan polivinilferrosen-co-2 hidroksietil metakrilat, amperometrik glukoz sensörleri için polimerik aracı olarak kullanılmıştır. Glukoz oksidaz ve redoks kopolimerleri karbon pasta ile karıştırılarak karbon pasta enzim elektrodu glukozun amperometrik ölçümü için hazırlanmıştır. Bu kopolimerler glukoz oksidazın ön aktif merkezi ve elektrot arasında polimerik araçlar olarak görev almışlardır. Biyosensörün cevap süresini ise 20 saniye olarak bulmuşlardır [29].

Vidal ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada glukoz ve kolesterol tayini için bir biyosensör hazırlamışlardır. İlk olarak polipirol filmi içerisine glukoz oksidaz enzimlerini hapsedmişlerdir ve poli-o-fenilendiamin film ile yüzeyi kaplamışlardır. Biyosensörün analitik performansı ile polipirol tabakasında oluşan biyosensörünkini karşılaştırmışlardır. Bunun sonucunda tek tabakalı elektrodun tayin sınırını $1,35 \mu\text{M}$, olarak bulmuşlardır [30].

Xu ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada glukoz oksidaz varlığında platin elektrotta p-klorofenolün elektrokimyasal polimerizasyonu ile yeni bir amperometrik glukoz biyosensörü geliştirmişlerdir. Biyosensörün amperometrik cevabı fosfat tamponunda enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenme gerilimi olan $0,60 \text{ V}$ 'da ölçülmüştür. Sensörün performansını farklı monomer derişimlerinde ve polimerizasyon potansiyellerinde incelemişlerdir. Biyosensörün optimum şartlarda $2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ile $1,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ arasında doğrusal cevap verdiğini ve cevap süresinin iki saniyeden daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Askorbik asit ve ürik asit için fark edilebilir bir girişim gözlenmemiştir. 90 gün sonra biyosensörün cevabı neredeyse hiç değişmemiştir [11].

R. Garjonyte ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada elektrokimyasal olarak biriktirilmiş polianilin tabakasına glukoz oksidaz enzimi immobilize edilerek hazırlanan glukoz sensörünün özelliklerini araştırmışlardır. Fosfat tamponundan elektropolimerizasyon işleminin bir basamağına kadar polianilinin bir tabakasındaki Prussia mavisi-modifiye platin elektrodu üzerine glukoz oksidazın immobilizasyonu ile seçici amperometrik glukoz sensörleri hazırlamışlardır. Askorbik asit ve asetaminofenin etkisi polianilinin geçirimsizliğinden dolayı tamamen giderilmiştir [6].

Huaguo Xue ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada iletken polianilin-poliizopren kompozit filmini elektrokimyasal yöntemle sentezlemişlerdir. Film glukoz oksidaz immobilize edilerek biçimlendirilmiş

glukoz sensörüdür. Biyosensör için uzun süre kararlılık ve yüksek seçicilik elde etmişlerdir. Ayrıca, uygulanan potansiyelin etkisini ve biyosensörün karakteristiği üzerine kompozit filminin bileşimini detaylı bir şekilde tanımlamışlardır [8].

Yang ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada enzimin yüzeye kovalent bağlanması için, gözenekli organik-inorganik sol jel bileşiklerini kullanmışlardır. Bu bileşikler grafit tozu, ferrosen, amino ve metil silikattan oluşmuşlardır. Grafit tozu elektrot için iletkenlik sağlamış; ferrosen yüzey ve enzimin aktif bölgesi arasında aracılık yapmış; amin grupları ise karboimid reaksiyonu üzerinden enzim için kovalent bağ oluşturmuştur. Glukoz biyosensörünün seçiciliğini değerlendirmek için girişim yapabilecek maddelerin etkisi araştırılmıştır (sakkaroz, fruktoz, maltoz, ksiloz, sülfat, oksalat, ürik asit). Deneyler pH=7 ve 26 °C de yapılmıştır. Fruktoz, maltoz, ksiloz, sakkaroz, oksalat hiçbir girişime yol açmazken; asetaminofen ve ürik asit 0,5 mM derişiminde girişim yapmıştır. Sülfat ve askorbik asit ise elektrot yüzeyinde doğrudan okside olmaktadır. Bundan dolayı ciddi bir girişime sebep olurlar. Glukoz için optimum elektrot cevabı 0,1-27 mM arasında doğrusal; hassaslık 1,3 $\mu\text{A mM}^{-1}$; kararlılık 2 ay ve tespit sınırı 26 μM olarak bulunmuştur [31].

Sung ve Bae 2002 yılında yaptıkları çalışmada yeni bir glukoz biyosensörü hazırlamak için pirol ile birlikte polianyon, polietilen glikol ve glukoz oksidazın elektrokimyasal polimerizasyonunu kullanmışlardır. Pt elektrot yüzeyinde polipirol matriksi içine glukoz oksidazı tutuklamışlardır. Daha sonra tutuklanan glukoz oksidaz, PEG (polietilen glikol) üzerinden polianyon ile birleşmiştir. PEG 1000, 2000, 3000, 4000 gibi dört farklı zincir uzunluğu denenmiş, bunların enzim immobilizasyonu ve elektrot işlevi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Enzim elektrodun hazırlanmasında 800 mV potansiyel ve 225 mC/cm^2 film kalınlığı kullanılmıştır. Elektrot üzerindeki immobilize enzimin aktivitesi 119-209 mU/cm^2 arasında değişmiştir. Biyoaktivite ise daha uzun

PEG' lerde artmıştır. Amperometrik cevap $270 \text{ nA mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ kadar değişen duyarlılık ile 20 mM glukoz derişimine kadar doğrusallık gözlemişlerdir [32].

Li ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada PB-modifiye camı karbon elektrot üzerindeki glukoz oksidaz immobilizasyonu silika sol-jel dış tabaka ile sağlanabilir olarak tanımlamışlardır. Biyosensör sandwich biçimindedir. Sensör düşük potansiyel ve sol-fel mikroortamında H_2O_2 için PB-modifiye elektrodunun elektro indirgenmesi ile yüksek seçimlilik ve hassaslık göstermektedir. Sol-jel film enzim tabakasının dış yüzeyinde kararlılığın ve hassaslığın artmasına katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir. Hazırladıkları biyosensörün 0,475 mM glukoz derişiminde yüksek hassaslık, $1,182 \mu\text{AmM}^{-1}$ eğim ve 0,02 mM tayin sınırı gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu biyosensörü diyabetik hastaların kan şekeri tayininde kullanmak üzere denemişlerdir [33].

Xianhua Pan ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada polianilin glukoz oksidaz sensörünün hazırlanmasında yeni bir metot araştırmışlardır. İlk olarak polianilin glukoz oksidaz elektrodunu tek bir basamakla elde etmişlerdir. Anilinin elektrokimyasal polimerizasyonuna kadar bir polimer filmi içine enzimler tutuklamışlardır. Daha sonra PANI elektrod filminden glukoz oksidaz uzaklaştırmak için $6,0 \text{ mol/dm}^3$ hidroklorik asit çözelsiyle hidroliz etmişlerdir. Son olarak, aktif PANI glukoz oksidaz sensörü tekrar elde etmek için PANI filmine glukoz oksidaz immobilize etmişlerdir. Substrat konsantrasyonu, potansiyel, pH, sıcaklık gibi çeşitli faktörlerin cevap akımına etkisini araştırmışlardır. Hazırlanan biyosensörün akım cevabı ilk 2 günde maksimuma ulaşmış, daha sonra 30 günlük bir süreçte sadece % 4,6 azalmıştır. İşlemde yapılan ikinci adım aktif enzim içeren tampon çözeltisindeki indirgenmiş polianilinin oksidasyon derecesi süresince enzim uygulanmıştır. Hazırlanan PANI glukoz oksidaz sensörünün karakterizasyonunu hakkında bilgiyi SEM, FT-IR, UV-Vis yardımıyla tespit etmişlerdir [34].

Luo ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada glukozun tayini için kolay hazırlanabilen ve homojen bir biokompoziti temel alan amperometrik bir biyosensör hazırlamışlardır. Bu biokompoziti chitosan hidrojel, altın parçacıkları ve glukoz oksidazın direkt ve kolay elektrokimyasal tutuklanma metotlarından yararlanarak hazırlamışlardır. Biyosensörün cevap süresini oldukça kısa bulmuşlardır. Glukoz için tayin sınırını $2,7 \mu\text{M}$; $5,0$ ile $2,4 \text{ mM}$ arasında doğrusallık sergilediğini belirtmişlerdir [35].

Haihui Zhou ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada nano-fibröz polianilin yayılmış platinyum mikropartiküllere dayanan amperometrik glukoz biyosensörün seçiciliği ve hassasiyeti üzerine çalışmışlardır. Poli(m-fenilendiamin) (PMPD), glukoz oksidazın varlığında platinyum-modifiye PANI üstüne depolamışlardır. PANI, Pt/PANI ve PMPD-GOD/Pt/PANI'nin morfolojisini taramalı elektron mikroskopuyla incelemişlerdir. Sonuçlardan PANI'nin nano-fibröz bir morfolojiye sahip olduğunu elde etmişlerdir. Enzim elektrot $2,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 'dan $12,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ 'a liner aralığında glukozu mükemmel bir yanıt performansı sergilemiştir. PMPD'nin seçici geçirgenliği sayesinde, enzim elektrodun ürik asit ve askorbik aside iyi bir zıt etkileşim gösterdiğini tespit etmişlerdir. Enzim elektrodun maksimum akım yoğunluğunu $917,43 \mu\text{A cm}^{-2}$ olarak; Michaelis-Menten sabitini ise $9,34 \times 10^{-3} \text{ M}$ olarak bulmuşlardır. Ayrıca bu glukoz biyosensörünün iyi kararlılık ve tekrarlanabilirliği sahip olduğunu belirtmişlerdir [36].

Kathleen Grennan ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada polianilin esas alınarak hazırlanan biyosensörün karakterizasyonunu ve optimizasyonunu araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sensör performansının iki yönünün optimizasyonu ve karakterizasyonunu açıklamaktadır. (iletken polimer tabakası(polianilin) ve immobilizlenmiş protein tabakası). Elektrot yüzeyi üzerine elektrokimyasal olarak biriktirilmiş polianilin filminin kalınlığının etkisi amperometrik sensör performans özelliklerinin etkisiyle tanımlandığını belirtmişlerdir. Tamamladıkları filmin morfolojisi ve iletkenliğinin polimer

filminin kalınlığına etkisini de belirlemişlerdir. Protein immobilizasyonunun elektrostatik metodunu kullanmışlar, taramalı elektron mikroskobu yardımıyla sensör yüzeyi üzerindeki proteinlerin bir grubunun direkt görüntüsünü elde etmişlerdir. Artan protein derişiminin etkisi altında sensörün performansının anlaşılmasını sağlamışlardır [37].

Yuezhong Xian ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada Au nanopartikül (NPs)- iletken polianilin (PANI) nanofiberlerin kompozitlerine dayanan yeni bir glukoz biyosensörü geliştirmişlerdir. Hidrojen peroksidin elektrokimyasal oksidasyonu ile nanokompozit yüzeyi üzerine Nafion ve glukoz oksidazla immobilizlenmiş, glukozu duyarlı hassas ve seçici bir biyosensör geliştirmişlerdir. Glukoz biyosensörü için $5,0 \times 10^{-7}$ M ve 2,3 mA/M'lık eğim ve algılama kararlılığıyla $8,0 \times 10^{-4}$ mol/L ile $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L aralığında lineer bir kalibrasyon eğrisi elde etmişlerdir. Ayrıca, glukoz biyosensörünün mükemmel bir tekrarlanabilirlik ve iyi işlevsel kararlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir [38].

P. D. Gaikwad ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada polianilin-sülfürik asit ve glukoz oksidaz elektrodunu incelemişlerdir. 1mA/cm^2 akım, 1,0 pH, 1,0 M H_2SO_4 ve 0,2 M anilin ile potansiyometrik metotla Polianilin-sülfürik asit filminin sentezi için platin elektrot kullanmışlardır. Sentezlenen polianilin-sülfürik asit filmlerini taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier dönüştürücü infrared spektroskopisi (FTIR), UV-görünür bölge spektroskopisi, elektriksel iletkenlik ve elektrokimyasal tekniklerle karakterize etmişlerdir. Daha sonra glukoz, çapraz bağlama metoduyla sentezlenen polianilin-sülfürik asit filminin üzerine immobilize edilmiş, PANI- H_2SO_4 -GOD elektrodunun asetat ve fosfat tamponundaki hassaslığını incelenmiştir. Potansiyometrik ölçümler sonucunda fosfat tamponunun asetat tamponuna nazaran daha hızlı cevap verdiğini bulmuşlardır [7].

P. D. Gaikwad ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada glukozun

taini için potansiyometrik metod yardımıyla PANI-PVS-GOD elektrodu geliştirmişlerdir. ITO kaplı cam elektrotu 0,2 M anilin, 0,5 M PVS çözeltisi, 1,0 pH ve 1 mA/cm² akım yoğunluğuyla potansiyometrik metod kullanılarak PANI-PVS filminin sentezi için kullanmışlardır. Sentezledikleri PANI-PVS kompozit filmini elektrokimyasal teknik, elektrik iletkenliği, UV-görünür bölge spektroskopisi, FTIR spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskopisi yardımıyla karakterize etmişlerdir. Daha sonra glukoz oksidazı; PANI-PVS filminin üzerine gluteraldehitte çapraz bağlama yoluyla immobilize etmişlerdir. Fosfat ve asetat tamponundaki PANI-PVS-GOD elektrodunun duyarlılığı üzerine çalışmışlardır. Yaptıkları potansiyometrik ölçümler sonucunda asetat tamponuna karşın fosfat tamponunda daha hızlı cevaplar alındığını belirtmişlerdir [9].

Dan Shan ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada elektropolimerizasyon yöntemini kullanarak elektrokimyasal biyosensör dizayn etmişlerdir. Glukoz oksidazın varlığında poli(akrilonitril-ko-akrilik asit)-kaplı platin elektrodundaki anilinin elektropolimerizasyonuyla biyolojik film hazırlamışlardır. EIS ve SEM' in sonuçlarından kompozit polimer filmdeki enzim için başarılı bir immobilizasyonun gerçekleştirildiğini belirtmişlerdir. Yeni glukoz biyosensörü iyi seçicilik ve kararlılık sergilemiştir. Birbirini izleyen 40 ölçümden ve 4 °C fosfat tamponu çözeltisinde saklanarak aralıklı olarak yaptıkları 45 günlük ölçümden sonra aktivitede belli bir kayıp gözlememişlerdir. Ayrıca, sensörün amperometrik cevabı üzerine sıcaklık, çözeltinin pH'sı, uygulanan potansiyelin etkisiyle beraber biyosensörün optimizasyonunu araştırmışlar ve tartışmışlardır [39].

Lihuan Xu ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada polianilinle kaplı karbon nanotüplerinin nanokompozitleri (CNT) ve dendrimer-içeren Pt nanopartiküllerine (Pt-DENs) dayanan amperometrik glukoz biyosensörü hazırlamışlardır. Proton ekli PANI ile kaplı CNT sentezlemişler ve Pt-DENs; PANI/CNT kompozit yüzeyi üzerine absorbe etmişlerdir. Sonra glukoz oksidazı çapraz bağlama yöntemiyle Pt-DENs/PANI/CNT kompozit film

üzerine immobilize etmişlerdir. Sonuçta hazırladıkları GOx/Pt-DENs/PANI/CNT elektrodun glukozu karşı mükemmel cevap performansı (düşük algılama seviyesi, geniş liner aralığı, kısa cevap zamanı, yüksek duyarlılık ve kararlılık) gösterdiğini ifade etmişlerdir [40].

Chen Hailing ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada Prussian Blue modifiye edilmiş camı karbon elektrodu üstüne modifiye silikat-polivinil asetat matriksindeki glukoz oksidazın immobilizasyonuna dayanan amperometrik glukoz biyosensörü geliştirmişlerdir. Yüksek kararlı PB-modifiye elektrodunu CV voltametrisini kullanarak etilendiamin tetraasetik asit, FeCl_3 , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 'nin elektrokimyasal çöktürülmesiyle hazırlamışlardır. CV şeklinin potansiyel aralığının etkisi, elektrolit katyonları, uygulanan potansiyel, pH, sıcaklık ve beraberinde var olan substratlar araştırılmıştır. Glukoz biyosensörün algılama sınırını; $20 \mu\text{molL}^{-1}$ 'den $2 \mu\text{molL}^{-1}$ 'e lineer aralıkla $8,1 \mu\text{molL}^{-1}$ olarak bulmuşlardır. Hazırlanan biyosensörün hızlı cevap, iyi seçicilik, mükemmel tekrarlanabilirlik ve kararlılık gösterdiğini belirtmişlerdir [41].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Cihazlar ve malzemeler

3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Amperometrik ölçme işlemlerinde BAS Epsilon-EC-Ver 1.40.67 NT elektrokimyasal analiz cihazı kullanıldı.

3.1.2. Hücre ve elektrotlar

Amperometrik ölçme işlemlerinde Şekil 3.1' de verilen üç elektrotlu ölçme sistemi kullanıldı. Referans elektrot olarak BAS RE-5B no'lu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak MW-1032 no'lu platin tel ve çalışma elektrodu olarak 0,5 cm² yüzey alanlı ve polianilin-polivinilsülfonat ile kaplanmış Pt levha elektrotlar kullanıldı.



Şekil 3.1. Kaplama ve ölçme yapmada kullanılan hücre sistemi

3.1.3. pH metre

Tampon çözeltilerinin pH'larının ölçülmesinde ORION Model 720A pH-iyonmetre cihazı kullanıldı.

3.1.4. Su banyosu

Isıtma, soğutma ve sabit sıcaklık çalışmalarının gerektiği durumlarda Grant W14 marka termostatlı sirkülasyonlu su banyosu kullanıldı.

3.1.5. Mikro pipet

5 μ L – 500 μ L çözelti ilaveleri için Volac marka $\pm$ 0,05 μ L hassasiyeti olan mikro pipetler kullanıldı.

3.1.6. Argon gazı

Çözeltide çözünmüş halde bulunan oksijeni uzaklaştırmak için Kargaz firmasından temin edilen yüksek saflıktaki (% 99,99) argon gazı kullanıldı.

3.1.7. Saf su

Çözeltinin hazırlanmasında kullanılan saf su; GFL marka saf su cihazından sağlandı.

3.1.8. SEM analizi

Gazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümünde Joel 6360 marka cihaz ile elektrotların yüzey fotoğrafları elde edildi.

3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar

Kimyasal Madde	Saflık Derecesi	Temin Edildiği Firma
Anilin	%99,5 $\delta=1,02\text{g/cm}^3$	Merck
Polivinilsülfonat	%25 $\delta=1,18\text{ g/mL}$	Aldrich
Sodyum hidroksit (NaOH)	% 96	Fluka
Hidroklorik asit (HCl)	% 36,5	BDH
Sodyum monohidrojen fosfat (NaHPO ₄)	-	Merck
Sodyum dihidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	-	Merck
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	%35 $\delta=1,13\text{kg/L}$	Merck
Sodyum perklorat (NaClO ₄)	% 98	Aldrich
Glukoz	-	Merck
Ürik asit (C ₅ N ₄ O ₃ H ₄)	% 99	Sigma
Askorbik asit (C ₆ H ₈ O ₆)	% 99,7	BDH
Parasetamol (Asetaminofen)	% 99,4	-
Trikloro asetik asit (TCA)	% 99,5	Merck

3.2.1. Kullanılan çözeltiler

Hidrojen peroksit: % 35' lik $\delta=1,13\text{kg/L}$ olan hidrojen peroksitten belirli bir miktar alınarak derişimi yaklaşık 0,1 M olacak şekilde 100 mL stok çözelti hazırlandı. Farklı derişimlerdeki hidrojen peroksit çözeltileride suyla seyreltilerek hazırlandı.

Fosfat tamponu: Monosodyum hidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfat belli miktarlarda tartılarak saf suda çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH' sı 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl ile 7,5'a ayarlandı ve çözeltideki analitik derişimi 0,1 M olacak şekilde seyreltildi. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında + 4 °C' ta saklandı.

Enzim çözeltisi: Toplam aktivitesi 100 ünite olan glukoz oksidaz enzimi alındı

ve saf suda çözüldükten sonra hacim ölçülü balonda 10 mL'ye tamamlandı (10 ünite/mL). Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi. Uzun süre kullanılmadığı zaman çözelti derin dondurucuda saklandı.

Glukoz çözeltisi: Belli bir miktarda tartılan glukoz pH' sı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponuyla $1,0 \times 10^{-3}$ M ve $1,0 \times 10^{-4}$ M 10 mL çözeltisi hazırlandı. Farklı pH ve derişimlerde glukoz çözeltisi hazırlamak içinde aynı yol izlendi. Hazırlanan glukoz çözeltisi en fazla 7 gün kullanıldı. Bu süre içinde buzdolabında muhafaza edildi.

Askorbik asit çözeltisi: Katı askorbik asitten belli bir miktar tartılarak derişimi 0,1 M olan fosfat tamponunda $1,0 \times 10^{-2}$ M, 10 mL stok askorbik asit çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki askorbik asit çözeltileri belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

Ürik asit çözeltisi: Katı ürik asitten belli bir miktar tartılarak 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisinde çözüldükten sonra fosfat tamponu eklenerek $1,0 \times 10^{-3}$ M, 10 mL stok ürik asit çözeltisi hazırlandı.

Parasetamol çözeltisi (asetaminofen): Katı parasetamolden belli bir miktar tartılarak, üzerine fosfat tamponu eklenip $1,0 \times 10^{-3}$ M, 10 mL stok parasetamol çözeltisi hazırlandı.

Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi: Katı trikloroasetik asitten belli bir miktar tartılıp kütlece % 10' luk 10 mL çözelti hazırlandı.

Sodyum perklorat: Katı sodyum perklorattan belli bir miktar tartılıp 1 M, 100 mL NaClO_4 çözeltisi hazırlandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı sodyum hidroksitten belli bir miktar alınıp saf suda çözülerek 0,1 M, 250 mL çözeltisi hazırlandı.

Hidroklorik asit çözeltisi: Derişik HCl' den belli bir miktar alınıp uygun şekilde seyreltilerek 0,1 M, 250 mL çözeltisi hazırlandı.

3.3. Platin Yüzeye Polianilin-polivinilsülfonat Kaplanması

Elektrot yüzeyinin temizlenmesi: Kaplama işleminden önce platin levhanın yüzeyi mekanik, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlendi. İlk olarak platin yüzeyi sıfır numara zımpara ile parlatıldı, daha sonra aleve tutuldu. 5 dakika süre ile aseton, etil alkol, derişik HCl ve derişik nitrik asit içerisinde bekletildi. Tekrar saf su ile yıkandı, kurutuldu ve yüzeydeki su uzaklaştırıldı. Her kaplama işleminden önce yüzey bu şekilde temizlendi [42].

Temizlenmiş Pt levha elektrodunun yüzeyi polianilin-polivinilsülfonat film ile kaplandı. Polianilin, elektrot yüzeyine anilinin elektropolimerleşmesi ile biriktirildi. Elektropolimerleşmede üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak platin levha (0,5 cm²), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Polianilin-polivinilsülfonat film elde etmek amacıyla anilinin hücre içi derişimi 0,2 M olacak şekilde 183,5 µL anilin, 2,5 mL polivinilsülfonat (%62), 7,3 mL su eklenmesiyle toplam 10 mL' lik bir çözelti hazırlandı. Bu çözeltiye temizlenmiş platin elektrot daldırıldı ve 10 dakika argon gazı geçirilerek çözeltideki oksijen uzaklaştırıldı. 0,75 V potansiyelinde anilinin polivinilsülfonatlı ortamda platin yüzeyde elektropolimerleşmesi gerçekleştirildi. Kaplama işleminden sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkandıktan sonra kullanılmak üzere tampon içinde bekletildi. Böylece platin/polianilin-polivinilsülfonat (Pt/PANI-PVS) elektrot hazırlandı. Hazırlanan Pt/PANI-PVS elektrodun yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile fotoğrafı çekildi.

3.4. Platin/Polianilin-Polivinilsülfonat (Pt/PANI-PVS) Elektrot İçin En İyi Çalışma Koşullarının Araştırılması

3.4.1. Polianilin-polivinilsülfonat filmin elde edilme potansiyeli

Anilinin polivinilsülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesi 0,75 V; 0,95 V; 1,10 V (Ag/AgCl)' da olmak üzere üç farklı sabit potansiyelde gerçekleştirildi. Belirtilen potansiyelerde kaplanan elektrodların hidrojen peroksit duyarlılıkları belirlendi. Her potansiyel için hidrojen peroksit derişimine karşı akım değışimi grafiğe geçirildi (Şekil 4.2).

3.4.2. Anilin derişiminin etkisi

Pt/PANI-PVS elektrot hazırlanırken kullanılan elektrokimyasal hücredeki anilin derişiminin elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığına etkisini incelemek amacıyla, elektropolimerleştirme işlemi 4 farklı anilin derişiminde gerçekleştirildi: 0,05 M; 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M. Elektrokimyasal hücreye hücre içi derişimi 0,05 M olacak şekilde anilin, 2,5 mL PVS ve 7,3 mL su konuldu. Bu çözeltiye temizlenmiş platin elektrot, Ag/AgCl elektrot ve platin tel daldırıldı. Daha sonra 10 dakika argon gazı geçirilerek ortamdan oksijen uzaklaştırıldı. 0,75 V'da anilinin polivinilsülfonatlı ortamda platin yüzeyde elektropolimerleşmesi gerçekleştirildi. Elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,5 olan fosfat tamponu çözeltisinden 9 mL ve 0,5 M sodyumperklorat çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Kararlı bir akım elde etmek için 0,40 V sabit potansiyelde dengeye getirildi. Daha sonra elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde hidrojen peroksit çözeltisi ilave edildi. 300 saniye karıştırıldı ve sabit potansiyelde 200 saniye sonunda akımlar kaydedildi. Bu işlemler diğer 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M anilin derişimleri için de gerçekleştirildi. Elde edilen akım farkları hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi ve grafikten elektropolimerleşme için en iyi anilin derişimi belirlendi.

3.4.3. Film kalınlığının etkisi

Film kalınlığının, elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığına etkisi farklı sürelerde kaplama işlemi gerçekleştirilerek incelendi. Bu amaçla platin elektrot yarım saat, 1 saat, 2 saat ve 3 saat sürelerinde; anilinin hücre içi derişimi 0,2 M olacak şekilde bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi kaplandı ve her bir elektrot pH' sı 7,5 olan fosfat tamponundan çözeltisinden 9 mL ve 1 mL sodyumperklorat çözeltisinden oluşan elektrokimyasal hücre içerisinde 0,40 V'da dengeye getirildi. Denge işleminden sonra elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde hidrojen peroksit çözeltisi ilave edilerek akımlar kaydedildi ve hidrojen peroksit karşı grafiğe geçirildi. Elde edilen grafikten farklı elektropolimerizasyon sürelerinden en uygun film kalınlığı belirlendi.

3.4.4. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Bölüm 3.3'de belirtildiği gibi hazırlanan Pt/PANI-PVS elektrot, Ag/AgCl elektrot ve platin tel pH'sı 7,5 olan 9 mL fosfat tamponu ve 1mL 0,5 M sodyumperklorattan oluşan hücreye daldırıldı. Elektrot 0,10 V' da dengeye getirildi. Daha sonra elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde hidrojen peroksit çözeltisi ilave edildi, her bir ilaveden sonra 300 saniye karıştırıldı ve 0,10 V' da 200 saniye sonra akımlar okundu ve kaydedildi. Elde edilen akım değerleri hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi. Diğer 0,20 V, 0,30 V, 0,40 V, 0,50 V, 0,60 V ve 0,70 V potansiyelleri için de aynı işlemler gerçekleştirildi. Elde edilen grafiklerden en iyi çalışma potansiyeli belirlendi.

3.4.5. pH'nın etkisi

Hazırlanan Pt/PANI-PVS elektrodunun amperometrik cevap akımı üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla pH'sı 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5 olan fosfat tamponu hazırlandı. Hücre içine pH'sı 5,5 olan 9 mL tampon çözeltisi ve 1mL sodyumperklorat ilave edildi. Elektrot 0,40 V' da dengeye getirildi. Denge işleminden sonra farklı derişimlerde hidrojen peroksit ilaveleri yapıldı ve elde edilen akımlar kaydedildi. Aynı işlemler pH değeri 6,5; 7,5; 8,5; 9,5 olan fosfat

tamponları içinde tekrarlandı. pH değerlerine karşı akım farkları grafiğe geçirildi.

3.5. Platin/ Polianilin-Polivinilsülfonat Elektrodu Kullanılarak Serbest Enzim İle Hücrede Oluşan H_2O_2 'in Ölçülmesi

Bölüm 3.3'de belirtildiği gibi hazırlanan elektrot; 9 mL fosfat tamponu, 1 mL sodyumperklorat ve 100 μ L glukoz oksidaz enzimi bulunan hücreye daldırıldı. Elektrot sabit potansiyelde 0,40 V' da dengeye getirildikten sonra farklı derişimlerde glukoz çözeltisi ilaveleri yapıldı. İlaveler sonucunda hücrede oluşan akımlar okundu ve glukoz derişimine karşı grafiğe geçirildi.

3.6. Enzim Elektrodunun Hazırlanması

Glukoz oksidaz enzimi, polimerin elektrot yüzeyinde oluşumu sırasında ortama konularak polimere hapsedme yöntemiyle immobilize edildi. Bu işlem için üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak platin levha (0,5 cm²), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Bir hücre içerisine 183,5 μ L anilin; 2,5 mL polivinilsülfonat (%62), 1 mL glukoz oksidaz (10 ünite/mL) enzimi ve 6,3 mL saf su konarak 10 mL'lik bir çözelti hazırlandı. Bu çözelti içerisine temizlenmiş platin levha, Ag/AgCl elektrot ve platin tel daldırıldı. 0,75 V sabit potansiyelde 1 saat bekletilerek platin yüzeyine anilinin polimerleşmesi sırasında polimer içine enzim hapsedildi ve böylece enzim elektrot hazırlanmış oldu.

Elektropolimerleşmeden sonra elektrot yüzeyi bol su ile yıkandı ve enzim elektrodun taramalı elektron mikroskobu(SEM) ile fotoğrafı alındı.

3.7. Enzim Elektrodunun Glukoza Duyarlılığının Belirlenmesi

Bölüm 3.6'daki gibi hazırlanan enzim elektrodunun glukoza duyarlılığının belirlenmesi için üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Üçlü elektrot sisteminde

Çalışma elektrodu olarak hazırlanan enzim elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot, karşıt elektrot olarak ise platin tel kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH'sı 7,5 olan fosfat tamponundan 9 mL ve 1 M' lık sodyumperklorat çözeltisinden 1 mL konuldu. 0,40 V sabit potansiyelde enzim elektrot dengeye getirildi. Kararlı hale gelmesinden sonra farklı derişimlerde hazırlanan glukoz zeltelerinden ilaveler yapıldı. Her ilaveden sonra çözelti 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye sonra akım değerleri okunup, kaydedildi. Glukoz derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiğe geçirildi ve glukoz için duyarlı çalışma aralığı belirlendi.

3.8. Enzim Elektrodunun En İy alışma Koşullarının Belirlenmesi

Enzim elektrodunun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi için pH'nın etkisi, sıcaklığın etkisi, substrat derişiminin etkisi, enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrünün belirlenmesi çalışıldı.

3.8.1. pH'nın etkisi

Bölüm 3.6'da ki gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine pH'nın etkisini incelemek için pH'sı 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5 olan tampon zelteler hazırlandı. Bu tampon zeltelerle $1,0 \times 10^{-3}$ M' lık glukoz çözeltisi hazırlandı. Hücre içine pH değeri 5,5 olan tampon çözeltisinden 9 mL ve sodyumperklorat çözeltisinden 1 mL konuldu. Elektrot bu zeltide 0,40 V'da dengeye getirildi. Sonra pH değeri 5,5 olan tampon çözeltisiyle hazırlanan glukoz çözeltisinden hücredeki glukoz derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde hücreye ilave edildi. 300 saniye karıştırıldı ve 0,40 V sabit potansiyelde 200 saniye sonra akım değerleri kaydedildi. Aynı işlemler pH değeri 6,5; 7,5; 8,5; 9,5 olan fosfat tamponları için tekrarlandı. Farklı pH değerlerindeki her bir çözelti için 0,40 V sabit potansiyelde ölçülen akım değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirildi ve grafikten biyosensörün optimum çalışma pH değeri belirlendi.

3.8.2. Sıcaklığın etkisi

Hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla beş farklı sıcaklık değerinde biyosensörün amperometrik cevabı ölçüldü. Hücre içine 9 mL tampon çözeltisi ve 1 mL sodyumperklorat çözeltisi konuldu. Hücre içindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C olacak şekilde ayarlandı ve hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde glukoz çözeltisi ilave edildi. 300 saniye karıştırıldıktan sonra sabit potansiyelde 200 saniye sonra akım değerleri okunup, kaydedildi. Aynı işlemler 30 °C; 40 °C; 50 °C ve 60 °C sıcaklıkları için tekrarlandı. Sıcaklığa karşı ölçülen bu akım değerleri grafiğe geçirildi.

3.8.3. Substrat derişiminin etkisi

Hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün glukozu cevabı ve çalışma aralığı belirlendi. Bunun için $1,0 \times 10^{-9}$ M – $1,0 \times 10^{-1}$ M derişim aralığındaki glukoz çözeltilerine karşı biyosensörün amperometrik cevabı ölçüldü. Ölçülen bu amperometrik akımlar glukoz derişimine karşı grafiğe geçirildi. (Michaelis-Menten eğrisi). Çizilen bu grafikten yararlanılarak biyosensörün çalışma aralığı ve tayin sınırı belirlendi. Ayrıca elde edilen verilerden Linewear-Burke grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanarak glukoz oksidaz enzimine özgü olan $K_M(\text{gözlenen})$ ve $V_{\text{maks}}(\text{gözlenen})$ değerleri belirlendi.

3.8.4. Enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.6'ya göre hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün optimum şartlarda tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için $1,0 \times 10^{-5}$ M derişiminde glukoz çözeltileri ile arka arkaya ölçümler yapıldı. Bu ölçümler sonucunda elde edilen amperometrik cevap akımlarına karşı ölçme sayısı grafiğe geçirildi ve bu grafikten ölçülen akım değışiklikleri kullanılarak elektrodun tekrarlanabilir sonuçlar verdiği belirlendi.

3.8.5. Enzim elektrodunun raf ömrünün belirlenmesi

Hazırladığımız biyosensörün amperometrik cevap akımı 35 gün boyunca değişik aralıklarla $1,0 \times 10^{-5}$ M glukoz derişiminde ölçüldü. Bu süre esnasında biyosensör $+4$ °C'da buzdolabında bekletildi. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen amperometrik cevap akımları saklama süresine karşı grafiğe geçirilerek enzim elektrodun raf ömrü belirlendi. Raf ömrünü belirleme süresince buzdolabında fosfat tamponu içinde bekletilen enzim elektrodun zaman geçtikçe polimerden enzimin sızıp sızmadığı kontrolü yapıldı. Bu amaçla elektrodun saklandığı fosfat tamponuna glukoz ilaveleri yapılarak akımda değişiklik olup olmadığı gözlemlendi.

3.8.6. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler

Hazırlanan biyosensörün optimum şartlarda elde edilen amperometrik cevap akımı üzerine biyolojik sıvılarda girişim etkisi yapabilecek bazı maddelerin etkileri araştırıldı. Bunlardan ürik asit, parasetamol ve askorbik asidin girişim etkileri incelendi.

Ürik asidin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.6'ya göre hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün cevap akımı üzerine ürik asidin girişim etkisini incelemek üzere glukoz derişiminin $1,0 \times 10^{-5}$ M olduğu hücre ortamına stok ürik asit çözeltisinden kandaki sınır değeri olan $3,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ilave edildi. Daha sonra 0,40 V potansiyelde amperometrik cevap akımı ölçüldü. Elde edilen akım değerleri Çizelge 4.2'de verildi. Gözlenen cevap akımları hücredeki $1,0 \times 10^{-5}$ M derişimindeki glukoz ve çalışılan derişimdeki ürik asidin oluşturduğu cevap akımlarının toplamı olduğu için cevap akımları toplam akım olarak verildi. $1,0 \times 10^{-5}$ M glukoz derişimine karşılık gelen amperometrik cevap akımı hesap edilip toplam cevap akımından bu akım değeri çıkarıldı. Kalan cevap akımı

çalışılan derişimdeki ürik asidin cevap akımıdır. Daha sonra çalışılan ürik asit derişiminin yüzde olarak ne kadar girişim yaptığı hesaplandı.

Parasetamolün (asetaminofen) girişim etkisinin incelenmesi

Parasetamolün girişim etkisini incelemek üzere hazırlanan stok parasetamol çözeltisinden, glukoz derişiminin $1,0 \times 10^{-5}$ M olduğu hücre ortamına, kandaki sınır değeri olan $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ilave edildi. Daha sonra 0,40 V sabit potansiyelde amperometrik cevap akımı ölçüldü. Aynı işlemler $1,0 \times 10^{-6}$ M ve $1,0 \times 10^{-5}$ M parasetamol derişimleri içinde tekrarlandı. Ölçülen cevap akımları hücredeki glukoz ($1,0 \times 10^{-5}$ M) ve çalışılan derişimdeki parasetamolün oluşturduğu cevap akımlarının toplamıdır. $1,0 \times 10^{-5}$ M glukoz derişimine karşılık gelen cevap akımı bu toplam cevap akımından çıkarıldığında kalan cevap akımı; çalışılan derişimdeki parasetamolün cevap akımı olarak hesaplandı ve bu hesaplanan cevap akımları ile çalışılan parasetamol derişiminin yüzde olarak ne kadar girişim yaptığı belirlendi. Hesaplanan bu değerler Çizelge 4.2’de verildi.

Askorbik asidin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.6’ya göre hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün cevap akımı üzerine askorbik asitin girişim etkisi incelendi. Glukoz derişiminin $1,0 \times 10^{-5}$ M olan hücre ortamına, kandaki üst sınır değeri olan $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde hazırlanan stok askorbik asit çözeltisinden ilave edildi. 0,40 V sabit potansiyelde amperometrik cevap akımı ölçüldü. $1,0 \times 10^{-5}$ M olan askorbik asit derişimi içinde aynı işlemler tekrarlandı. Bu derişimlerde ölçülen cevap akımları Çizelge 4.2’de verildi. Ölçülen cevap akımları hücredeki glukoz ($1,0 \times 10^{-5}$ M) ve çalışılan derişimdeki askorbik asidin oluşturduğu cevap akımının toplamıdır. Glukozun $1,0 \times 10^{-5}$ M derişimdeki amperometrik cevap akımı elde edilen toplam cevap akımlarından çıkartılarak askorbik asidin

cevap akımı hesaplandı. Daha sonra çalışılan askorbik asit derişiminin yüzde olarak ne kadar girişim yaptığı hesaplandı.

Askorbik asidin girişim etkisinin salatalık suyu ile giderilmesi

Glukoz derişiminin $1,0 \times 10^{-5}$ M olan hücre ortamına, kandaki üst sınır değeri olan $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde hazırlanan stok askorbik asit çözeltisinden ve 1mL salatalık suyundan ilave edildi. Bu şekilde yaklaşık 10 dakika beklendi. Daha sonra 0,40 V sabit potansiyelde amperometrik cevap akımı ölçüldü. $1,0 \times 10^{-5}$ M olan askorbik asit derişimleri içinde aynı işlemler tekrarlandı. Ölçülen bu akım değerleri toplam akım olarak kaydedildi. Glukozun $1,0 \times 10^{-5}$ M derişimdeki amperometrik cevap akımı bu toplam cevap akımlarından çıkartılarak askorbik asidin cevap akımı hesaplandı ve grafiğe geçirildi.

Askorbik asidin girişim etkisinin sıcaklık ile giderilmesi

Glukoz derişiminin $1,0 \times 10^{-5}$ M olan hücre ortamına, kandaki üst sınır değeri olan $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde hazırlanan stok askorbik asit çözeltisinden konuldu ve 90 °C' de 10 dakika bekletildi. Daha sonra 0,40 V sabit potansiyelde amperometrik cevap akımı ölçüldü. Aynı işlemler $1,0 \times 10^{-5}$ M olan askorbik asit derişimi içinde tekrarlandı. Ölçülen bu akım değerleri toplam akım değerleri olduğu için bu akım değerinden glukozun $1,0 \times 10^{-5}$ M derişimindeki amperometrik cevap akımı çıkartılarak askorbik asidin cevap akımı hesaplandı. Askorbik asit derişimine karşı ölçülen amperometrik cevap akımları grafiğe geçirildi.

3.8.7. Biyolojik sıvıda (kanda) glukoz tayini

Biyolojik sıvı olarak kullanacağımız kandaki glukoz tayini için üç sağlıklı bireyden kan örneği alındı. Bu örnekler steril kaplara alınarak muhafaza

edildi. Kan örneklerinden 2 numune alınarak biri Ankara Gazi Hastanesi' ne analiz için bırakıldı. Diğer kan örnekleri ise analiz edilmek üzere laboratuvarımıza getirildi ve buzdolabına konularak muhafaza edildi.

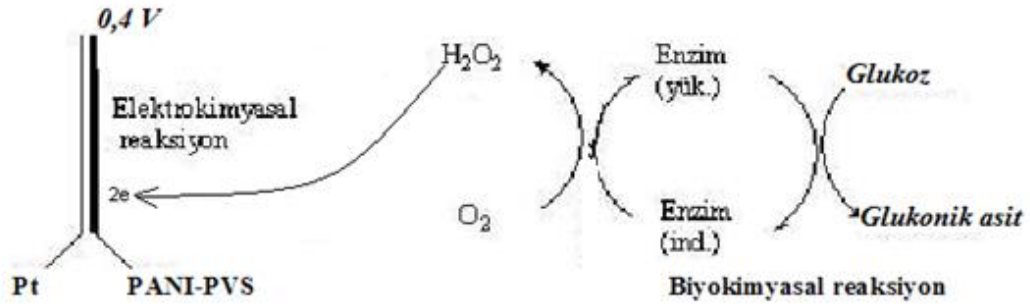
Kan analizleri kan serumundan yapılmaktadır. Bunun için kan örneklerinden bir miktar alındı ve 2500 rpm' de, 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst kısımda kalan kan serumu alındı. Kan serumunda bulunan proteinlerin yapacağımız analiz sırasında girişimini önlemek için % 10' luk trikloroasetik asit kullanılarak proteinlerin çökmesi sağlandı. Çöken proteinler sonucu oluşan çökelek süzülerek ortamdan uzaklaştırıldı. Proteinleri çöktürülmüş olan kan serumu analiz yapılincaya kadar buzdolabında saklandı.

Kan serumunda glukoz tayini için seyreltme işlemleri yapıldı. Seyreltme işlemi sayesinde kan serumundaki glukoz derişimi biyosensörün doğrusal çalışma aralığına getirilmesi ve girişim yapan maddelerin biyosensörün tayin sınırının altındaki bir derişime indirilmesi sağlandı.

Bölüm 3.6'da ki gibi hazırlanan ve dengeye getirilen enzim elektrodun kandaki glukoz miktarının belirlenmesi amacıyla, üçlü elektrot sistemli elektrokimyasal hücre kullanıldı. Bu hücrede çalışma elektrodu olarak hazırlanan enzim elektrot, karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH' sı 7,5 olan fosfat tamponu çözeltisi ve sodyum perklorat çözeltisi konuldu. Kan serumundan belli hacimler alındı ve 50 defa seyreltme işlemi olacak şekilde biyosensörün bulunduğu hücreye ilave edildi. Daha sonra 0,40 V sabit potansiyel uygulanıp hücreden geçen akım kaydedildi. Aynı işlemler alınan üç kan numunesi içinde gerçekleştirildi. Ölçülen akım değerlerinden kalibrasyon grafiğinde yerine kondu. y ekseninde ölçülen akım değerleri kalibrasyon grafiğinde yerine konarak glukoz derişimleri belirlendi.

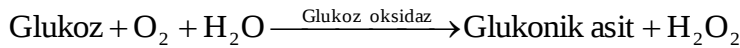
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada iletken bir polimer olan polianilin; platin yüzey üzerine polivinilsülfonatlı ortamda kaplandı. Bu film üzerine enzim hapsetme yöntemiyle immobilize edildi. Pt/Polianilin-polivinilsülfonat elektrodu ile enzimatik reaksiyon sonucunda glukozun ölçülmesinde çözeltide ve elektrot yüzeyinde gerçekleşen olaylar şematik olarak aşağıdaki şekilde gösterilmektedir.

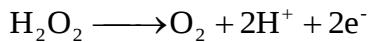


Şekil 4.1. Glukozun glukonik aside yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı

Glukoz oksidazın tutturulduğu PANI-PVS filmi çözeltideki glukoz ile temas ettiğinde oksijen varlığında glukoz oksidaz enziminin etkisiyle glukonik asit ve hidrojen peroksit oluşmaktadır.



Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit elektrot yüzeyinde yükseltgenmektedir. Hidrojen peroksidik anodik akımındaki artış glukoz derişimiyle orantılıdır.

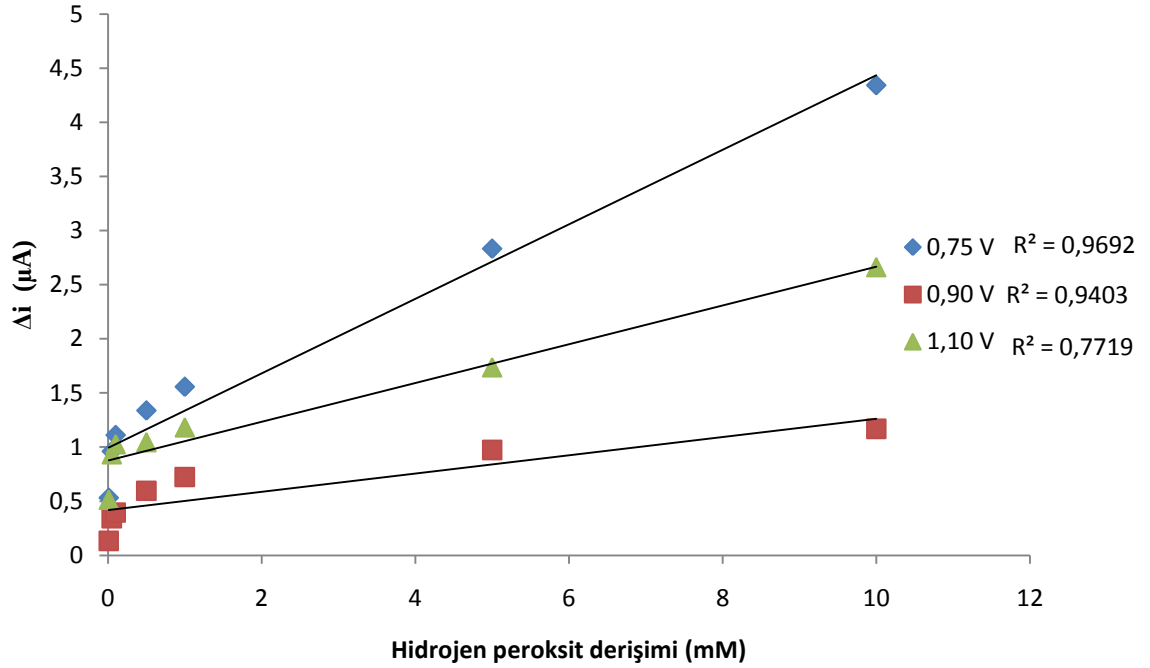


Çalışmada ilk olarak PANI-PVS filminin optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Daha sonra bu filme enzim immobilize edilerek elde edilen enzim elektrodun biyokimyasal ve analitik özellikleri incelenmiş ve ilgili sonuçlarla yorumlar aşağıda verilmiştir.

4.1. Platin/Polianilin-polivinilsülfonat Elektrot İçin En İyi Çalışma Koşullarının Araştırılması

4.1.1. Polianilin-polivinilsülfonat filmin elde edilme potansiyeli

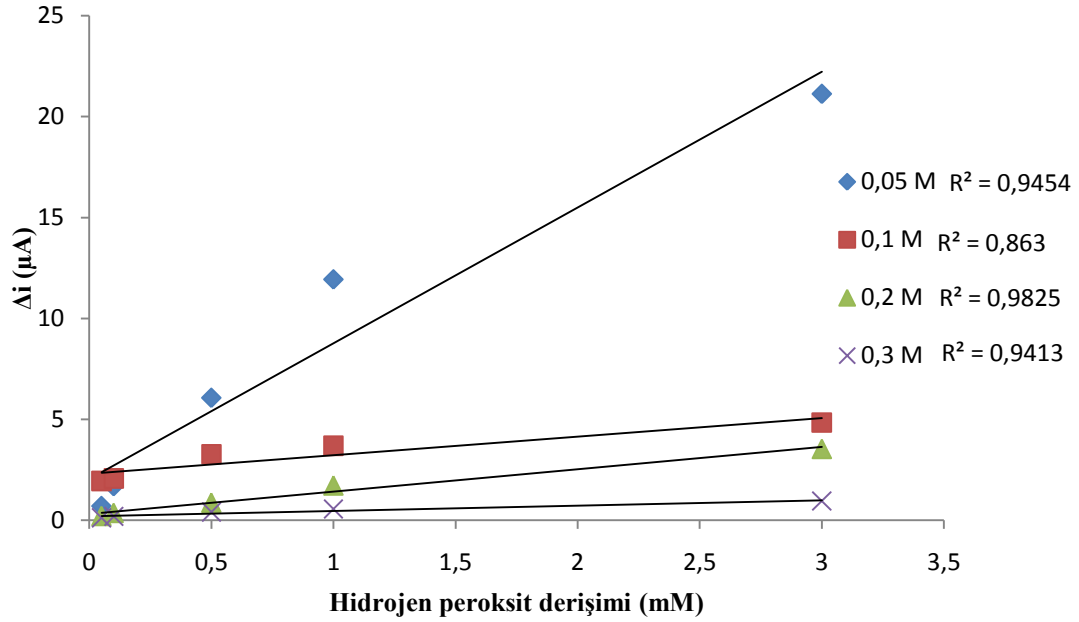
Bölüm 3.4.1' de belirtildiği gibi platin elektrot 0,75 V; 0,95 V ve 1,10 V olmak üzere üç farklı potansiyelde polivinilsülfonat ve polianilin ile kaplandı. Kaplama işlemi gerçekleştirildikten sonra elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığını belirlemek amacıyla yapılan hidrojen peroksit ilavelerinden sonra elde edilen akımlar hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi. Grafik incelendiğinde 0,75 V sabit potansiyelde elde edilen akım değerlerinin diğer potansiyellere göre daha yüksek olduğu ve 0,75 V potansiyelinde çizilen eğrinin doğrusallığının diğer potansiyellere göre daha iyi olduğu görülmektedir. Aynı zamanda yüksek potansiyelerde kaplanan filmin iletkenliğinin azaldığı sonucuna varıldı. Bu nedenlerden dolayı kaplama potansiyeli olarak en yüksek akımların görüldüğü 0,75 V seçildi.



Şekil 4.2. Pt/PANI-PVS filmin elde edilme potansiyeli

4.1.2. Anilin derişiminin etkisi

Bölüm 3.4.1' de belirtildiği gibi platin elektrotlar polivinilsülfonatlı ortamda 0,05 M; 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M derişimlerdeki anilin ile kaplandı. Bu dört farklı derişimlerde kaplanarak oluşturulan elektrotların 0,40 V sabit potansiyelde hidrojen peroksitde olan duyarlılığı incelendi ve elde edilen grafik Şekil 4.3'de verildi.

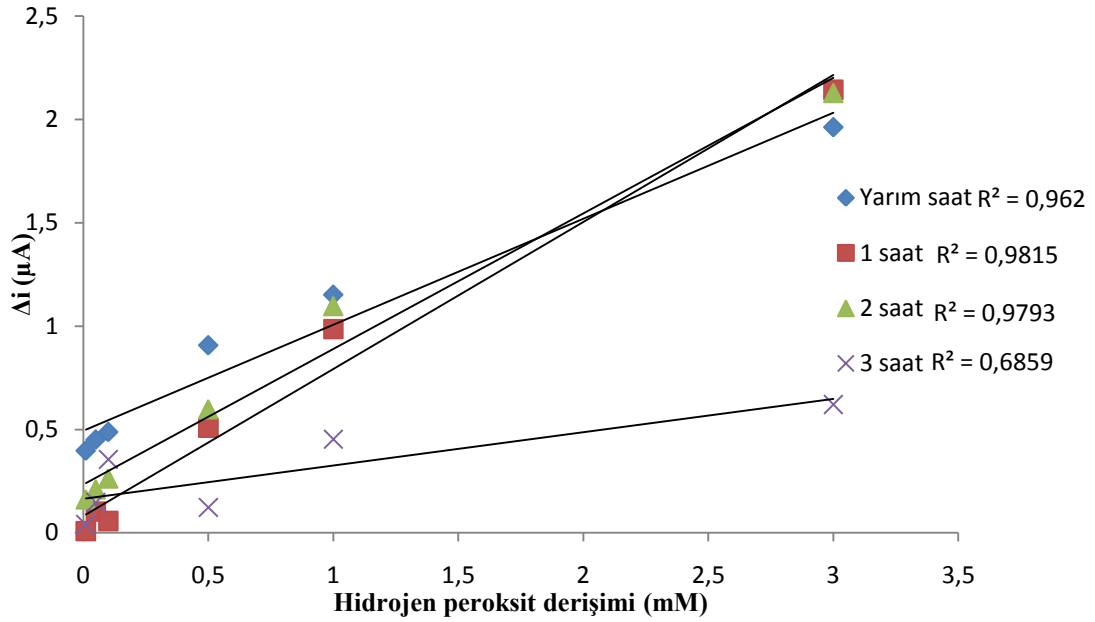


Şekil 4.3. Pt/PANI-PVS elektrodunun hidrojen peroksit duyarlılığına anilin derişiminin etkisi

0,05 M ve 0,1 M anilin derişimlerinde yapılan kaplamalarda elde edilen elektrotlar kullanılarak çizilen eğrilerin doğrusallığının düşük olduğu grafikten görülmektedir. 0,05 M'lık anilin derişiminde akımların diğerlerine göre yüksek olduğu görülmektedir. Fakat anilin derişimi 0,05 M olduğunda belirtilen süre içinde elektrot yüzeyi polianilin ile yeterince örtülmemekte çok ince tabaka oluşmaktadır. Bu nedenle 0,05 M derişiminde yapılan kaplamalardaki akım değerleri yüksek görülmektedir. 0,3 M derişimdeki anilin ile yaptığımız çalışmada ise kaplama işlemi hızlı bir şekilde gerçekleşti. Platin yüzeyde çok fazla polimer biriktiği görüldü, bu da elektrodun iletkenliğini azaltmıştır. Ayrıca bu derişimde çizilen kalibrasyon eğrisine bakıldığında doğrusallığın düşük olduğu görülmektedir. Bu nedenle 0,3 M anilin derişiminin kaplama için uygun olmadığı sonucuna varıldı. 0,2 M anilin derişiminde çizilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallığının oldukça iyi olduğu görüldü. Bundan dolayı en uygun anilin derişimi 0,2 M olarak seçildi.

4.1.3. Film kalınlığının etkisi

Polimer filminin kalınlığının, iletken polimerlere dayanarak hazırlanan biyosensörlerin biyosensör cevabı üzerine etkisinin önemli olduğu literatürlerde yer almaktadır. Elektrot cevabına film kalınlığının etkisini belirlemek için elektrodun kaplama süresi değiştirildi. Bunun için dört farklı kaplama süresinde yarım saat, 1 saat, 2 saat, 3 saat kaplama işlemi gerçekleştirildi. Yarım saatlik yüzeyi kaplama süresinden başlanmasının nedeni; çalışmada kullandığımız platin elektrot ancak yarım saatte tamamen örtülmekteydi. Daha kısa sürelerde yapılan kaplama sonucunda elektrot yüzeyinin tam olarak kaplanmadığını, kaplama kalınlığının ince olduğu belirlendi. Bu yüzden en ince film kalınlığına sahip elektrot olarak yarım saat kaplama yapılarak elde edilen polianilin kaplı elektrot alındı. Daha sonra kaplama süreleri artırılarak kaplamalar gerçekleştirildi. Bu şekilde hazırlanan 4 farklı film kalınlığına sahip Pt/PANI-PVS elektrodlarının hidrojen peroksit duyarlılığı incelendi ve hidrojen peroksit derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.4).



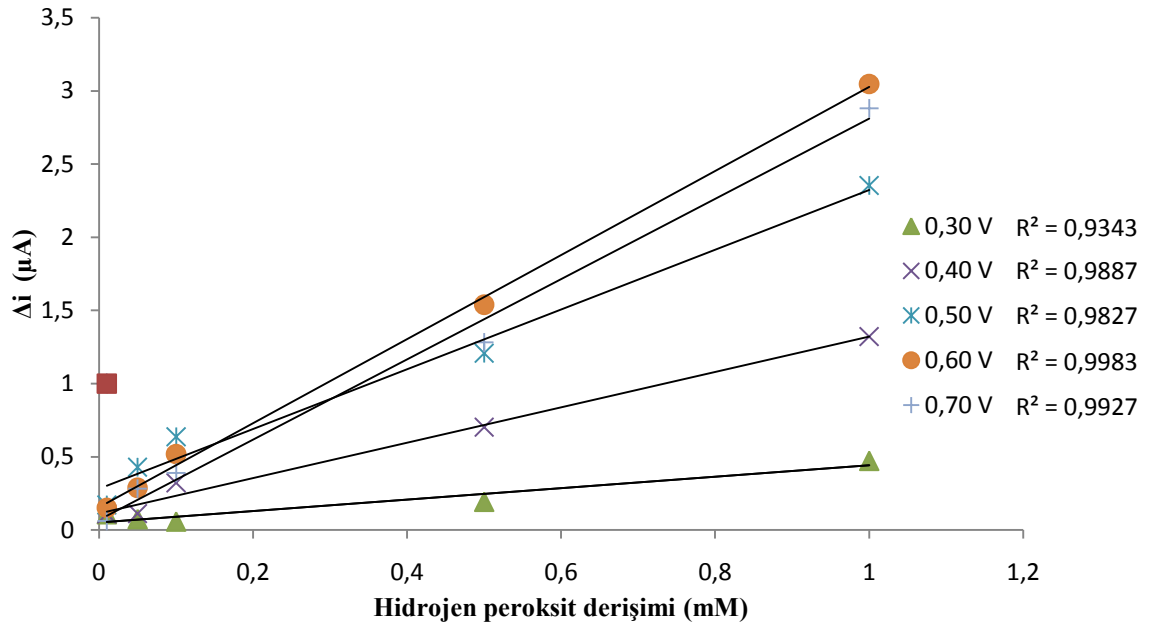
Şekil 4.4. Pt/PANI-PVS elektrodunun hidrojen peroksit duyarlılığına film kalınlığının etkisi

Grafik incelendiğinde dört farklı kaplama süresinden 1 saatlik kaplama süresi sonucunda elde edilen elektrot kullanılarak çizilen grafiğin doğrusallığının diğerlerinden daha iyi olduğu görülmektedir. Yarım saat ile gerçekleştirilen kaplama sonucunda hazırlanan elektrottaki platin yüzeyinde çok ince bir film oluştuğu görüldü. Bundan dolayı elektrodun çoklu kullanımında dayanaksız olabileceği düşünüldü. 1 saatten daha uzun sürelerle gerçekleştirilen kaplamalar sonucunda hazırlanan elektrotlar kullanıldığında; çözeltide kirlenme meydana geldiği ve kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı giderek azaldı. Aynı zamanda 2 ve 3 saatlik kaplama sürelerinde elektrot yüzeyindeki polimer tabakası çok fazla kalınlaştığı için iletkenlikte azaldı. Tüm bunlardan dolayı çalışmamızda en uygun film kalınlığı 1 saat süreyle kaplanan elektrotta elde edilmiştir.

4.1.4. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Bölüm 3.3' de belirtildiği gibi hazırlanan Pt/PANI-PVS elektrodunun farklı çalışma potansiyellerinde hidrojen peroksit duyarlılığı belirlendi. Bu amaçla

0,1 V; 0,2 V; 0,3 V; 0,4 V; 0,5 V; 0,6 V; 0,7 V gibi sabit potansiyellerde dengeye getirilen elektrotlar için alınan verilerle hidrojen peroksit derişime karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.5).

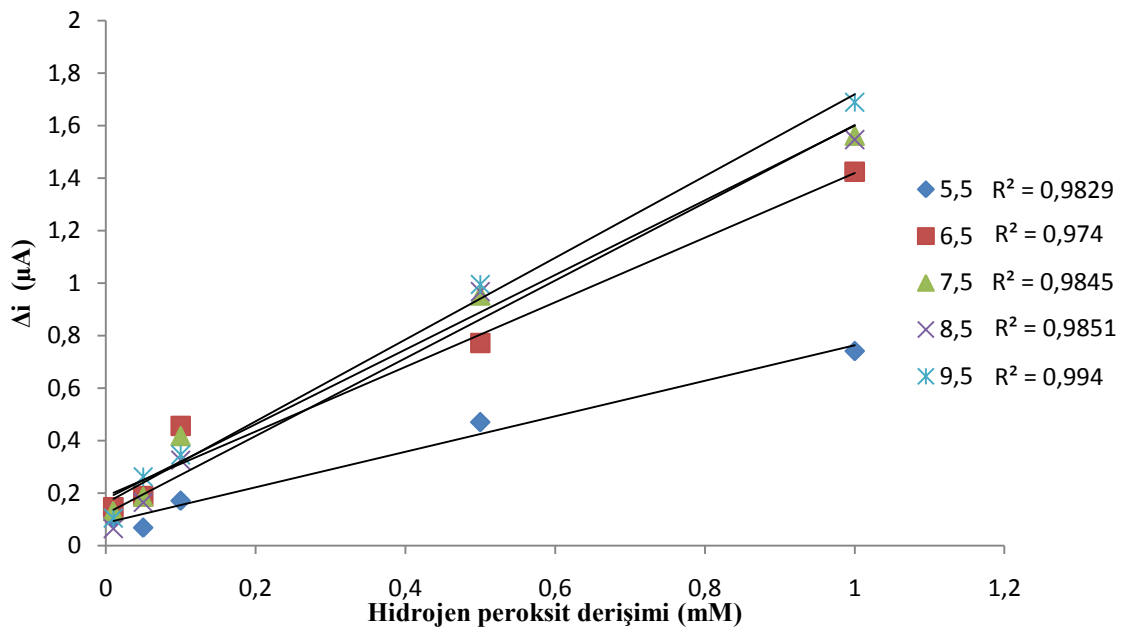


Şekil 4.5. Pt/PANI-PVS elektrodu kullanılarak farklı potansiyellerde hidrojen peroksit derişimi ile akım arasındaki ilişkinin incelenmesi

Grafik incelendiğinde yüksek potansiyel değerlerindeki akım değişiminin düşük potansiyel değerlerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. 0,10 V ve 0,20 V da yapılan çalışmalarda sıfıra yakın akım değerleri görüldü. O yüzden bu iki potansiyelde ölçülen akım değerleri grafikte gösterilmemiştir. Yüksek potansiyellerde çizilen eğrilerin doğrusallığının daha yüksek olduğu belirlendi. Ancak yüksek potansiyel değerlerinde girişim etkisi fazla olabileceği için daha düşük potansiyeller tercih edilmiştir. Girişim etkilerinin az olabileceği, 0,30 V da ki korelasyon katsayısı düşüktür. 0,40 V' daki yapılan ölçümler sonucu elde edilen doğrunun korelasyon katsayısı daha iyi olduğundan 0,40 V çalışma potansiyeli olarak seçildi.

4.1.5. pH' nın etkisi

Bölüm 3.3' de ki gibi hazırlanan elektrodun farklı beş pH değerinde (5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5) hidrojen peroksit duyarlılıkları incelendi. Elde edilen akım değerleri hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.6). Şekil 4.6. incelendiğinde pH' nın 5,5' dan bazik bölgeye kaymasıyla hidrojen peroksidin anodik akımlarının daha yüksek olduğu görüldü. En düşük anodik akımlar pH=5,5' da görüldü. pH 6,5' dan sonraki anodik akımlar çok daha yüksektir, fakat 6,5-9,5 arasındaki akımlarda çok büyük farklar yoktur. Sonuç olarak, PANI-PVS film ile hazırlanan biyosensörler için pH 6,5' dan sonraki pH değerlerinin çok daha uygun olabileceği düşünüldü.



Şekil 4.6. Pt/PANI-PVS elektrodunun hidrojen peroksit duyarlılığına pH' nın etkisi

Hazırlanan Pt/PANI-PVS elektrodun hazırlanması için en iyi koşullar Çizelge 4.1'de verildi.

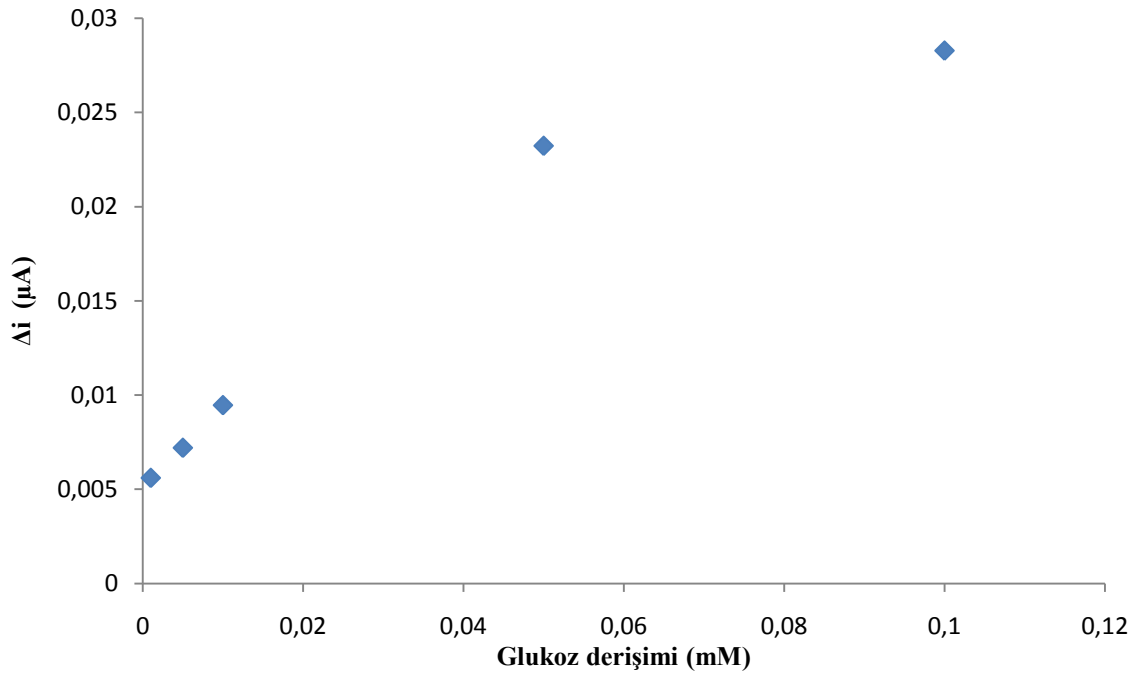
Çizelge 4.1. Pt/PANI-PVS elektrodunun hazırlanması için en iyi koşullar

DEĞİŞKENLER	OPTİMUM KOŞUL
PANI-PVS filmin elde edilme potansiyeli	0,75 V
Anilin derişimi	0,2 M
Film kalınlığı	1 saat kaplama süresi ile elde edilen film kalınlığı
Çalışma potansiyeli	+ 0,4 V

4.2. Serbest Enzim Çalışması

4.2.1. Substrat derişiminin etkisi

Bölüm 3.5' e göre yapılan deneyler sonucunda ölçülen amperometrik cevap akımları glukoz derişimine karşı grafiğe geçirildi.

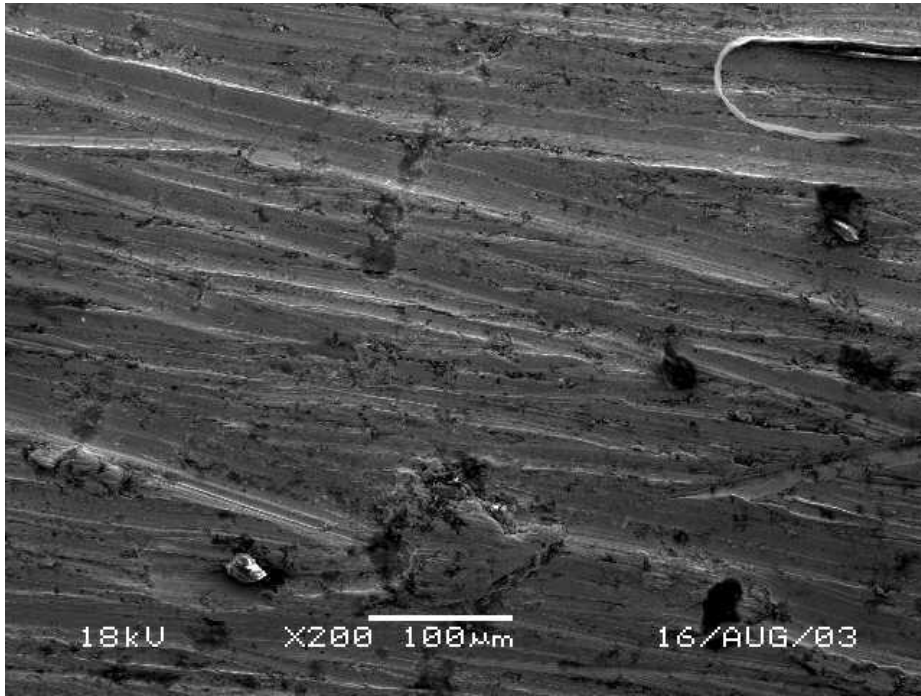


Şekil 4.7. Serbest enzimin aktivitesi üzerine glukoz derişiminin etkisi (pH=7,5 25 °C)

Grafiğe göre glukoz derişimi arttıkça akım değerlerinin arttığı, aynı zamanda Pt/PANI-PVS elektrodun glukozu duyarlı olduğu görölmektedir.

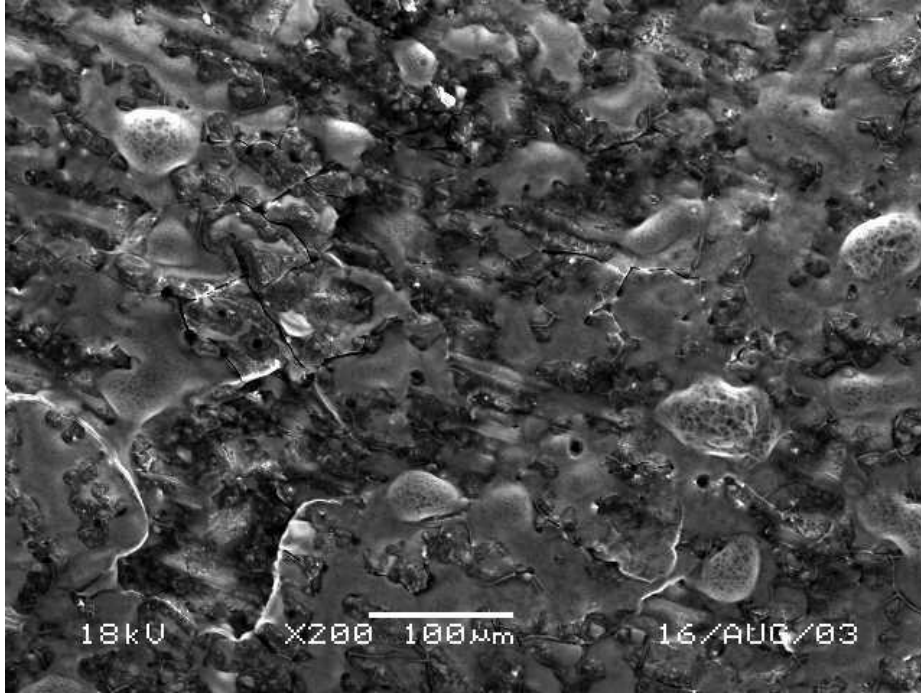
4.3. Enzim Biyosensörünün Hazırlanması

Yaptığımız çalışmada glukozu duyarlı bir biyosensör elde etmek amacıyla polianilin-polivinilsülfonat filme glukoz oksidaz enzimi immobilize edildi. İmmobilizasyon tekniğı olarak hapsetme yöntemi kullanıldı. Bölüm 3.6' da anlatıldığı gibi hazırlanan enzim biyosensörünün taramalı elektron mikroskobu ile çekilen fotoğrafı Şekil 4.8' de görölmektedir.



Şekil 4.8. Pt/PANI-PVS-Glukoz oksidaz enzim filminin SEM fotoğrafı

Pt/PANI-PVS elektrodunun taramalı elektron mikroskobu ile çekilen fotoğraf ise Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



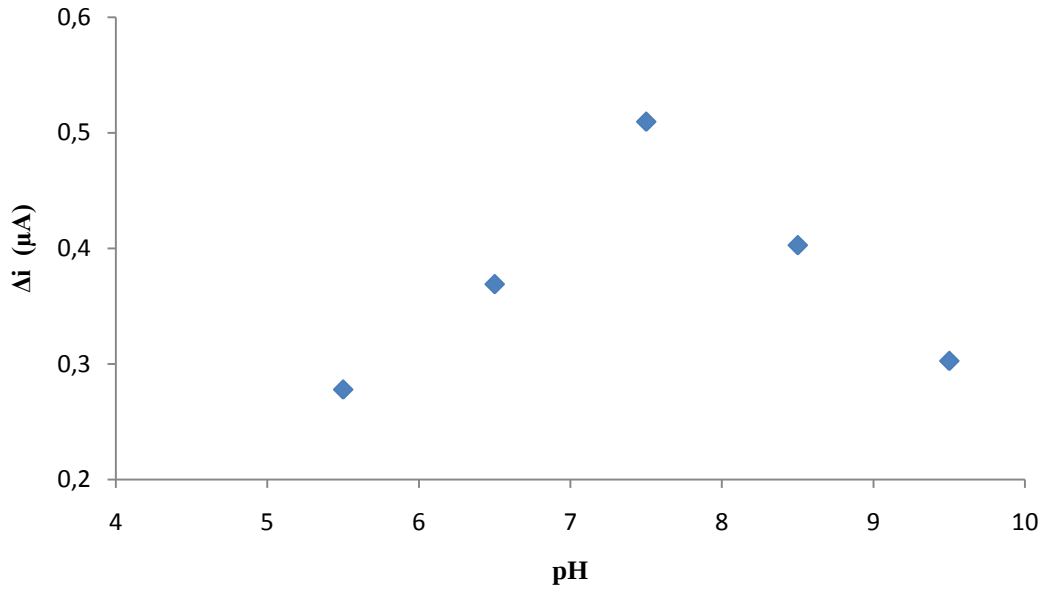
Şekil 4.9. Pt/PANI-PVS filminin SEM fotoğrafı

Enzim elektrodu yüzeyinin SEM fotoğrafına bakıldığında enzim moleküllerinin, polimer yapının üstünde değişik bir şekilde yerleşmiş olarak bulunmaktadır. Enzim ile kaplanan elektrot filminin SEM fotoğrafı ile enzimsiz kaplanan elektrot filminin SEM fotoğrafına bakıldığında ikisinin birbirinden çok farklı olduğu görülmektedir.

4.4. Glukoz Biyosensörünün En İyi Çalışma Koşulları

4.4.1. pH etkisi

Enzim elektrodlarının aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri çalışma ortamının pH değeridir. Çünkü enzimlerin aktivitesi pH' a bağlı olarak değişmektedir. Enzim elektrodunun aktivitesine ortam pH' sının etkisini araştırmak amacıyla $1,0 \times 10^{-5}$ M sabit glukoz derişiminde pH değeri değiştirilerek akımlar ölçüldü. Amperometrik cevap akımları pH' ya karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.10).

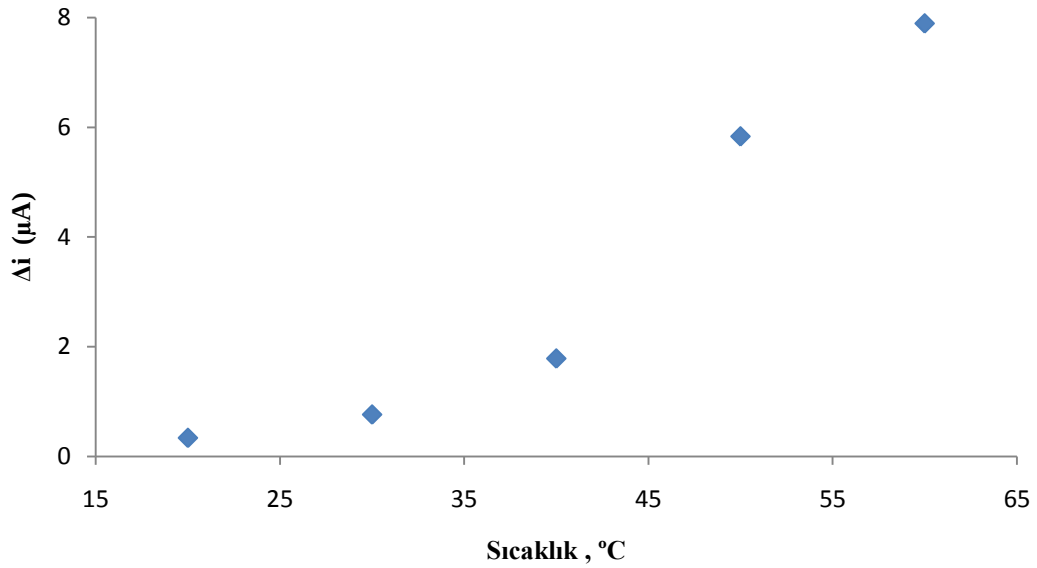


Şekil 4.10. Biyosensörün glukoz duyarlılığına pH' nın etkisi (0,1 M fosfat tamponu, 25 °C)

Grafik incelendiğinde enzim elektrodunun maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7,5 olarak belirlenmiştir. Literatürler incelendiğinde glukoz için pH değeri 6,8; 7,4; 7,3 olarak bulunmuştur [38, 9, 43].

4.4.2. Sıcaklığın etkisi

Sıcaklık, enzimlerin kararlılığını ve enzimatik reaksiyonların hızını etkileyen önemli bir faktördür. Her enzimin optimum aktiflik gösterdiği bir sıcaklık vardır. Bu amaçla hazırladığımız Pt/PANI-PVS-Glukoz oksidaz enzim elektrodunun 20 °C; 30 °C; 40 °C; 50 °C; 60 °C sıcaklık değerlerinde $1,0 \times 10^{-5}$ M sabit glukoz derişiminde amperometrik cevap akımları ölçüldü ve sıcaklık (°C)-akım farkı (μA) grafiği çizildi (Şekil 4.11).

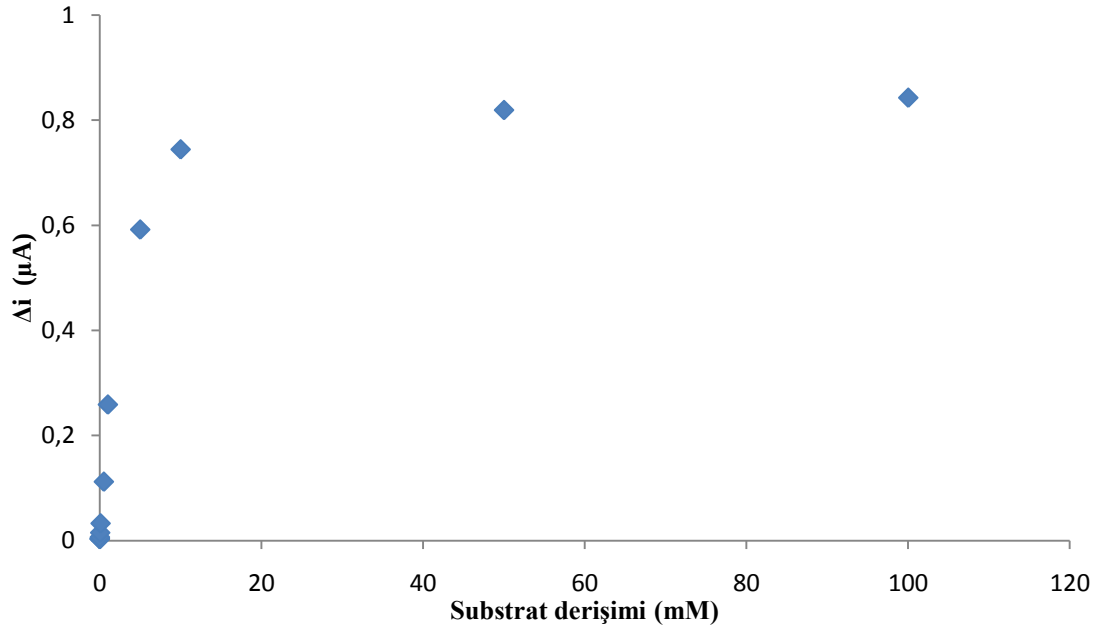


Şekil 4.11. Biyosensörün glukoza duyarlılığına sıcaklığın etkisi (0,1 M pH=7,5 fosfat tamponu)

Literatürler incelendiğinde Li ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 40 °C' den daha yüksek sıcaklıklarda akım değerlerinde düşme gözlemlemişlerdir ve sıcaklığı 25 °C olarak almışlardır [40]. Başka bir literatür de ise maksimum sıcaklık değeri 33 °C olarak bulunmuştur [38]. Şekil 4.11 incelendiğinde sıcaklığın artmasıyla akım farklarının da arttığı görülmektedir. Sıcaklık grafiğinde bir tepe noktası görülmemiştir. Literatürlerde benzer bir sıcaklık grafiğine rastlanamamıştır. Fakat bölümümüzde yapılan bir yüksek lisans tezinde ürikaz enzimine ait sıcaklık grafiğinde benzer bir durumla karşılaşılmıştır [44]. Bundan sonraki çalışmalar oda sıcaklığında yapılmıştır.

4.4.3. Substrat derişiminin etkisi

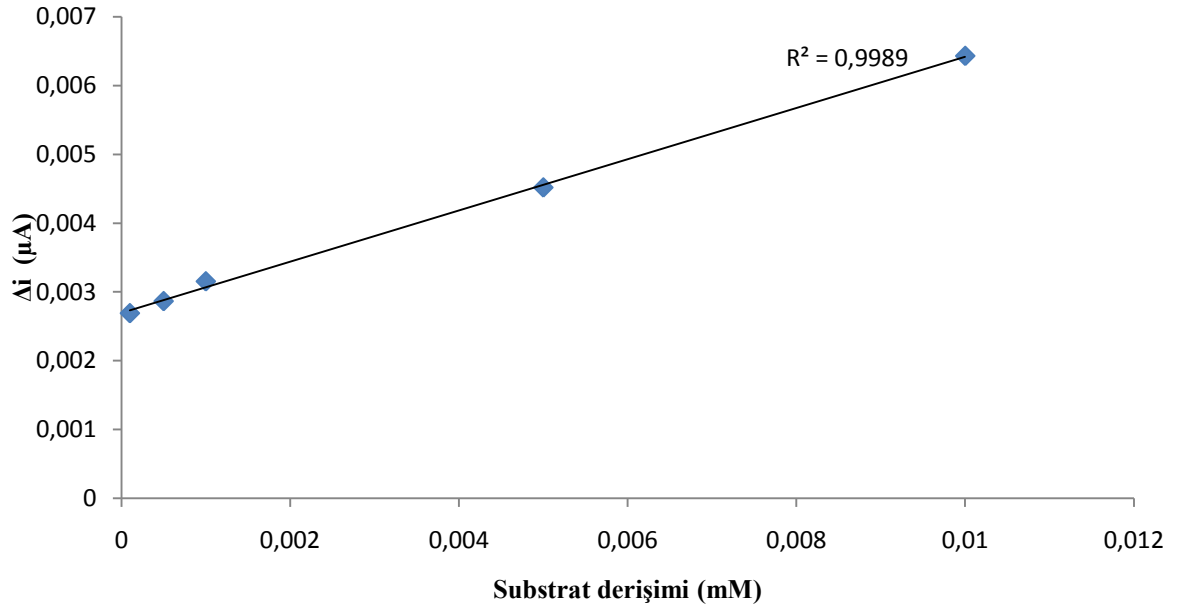
Hazırlanan Pt/PANI-PVS-Glukoz oksidaz elektrodunun doğrusal çalışma aralığının saptanması için ölçülen akım değerlerine substrat derişiminin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 10^{-9} M - 10^{-1} M derişim aralığında hazırlanan bir seri glukoz çözeltisi için akım değışimleri kaydedilerek grafiğe geçirildi (Şekil 4.12).



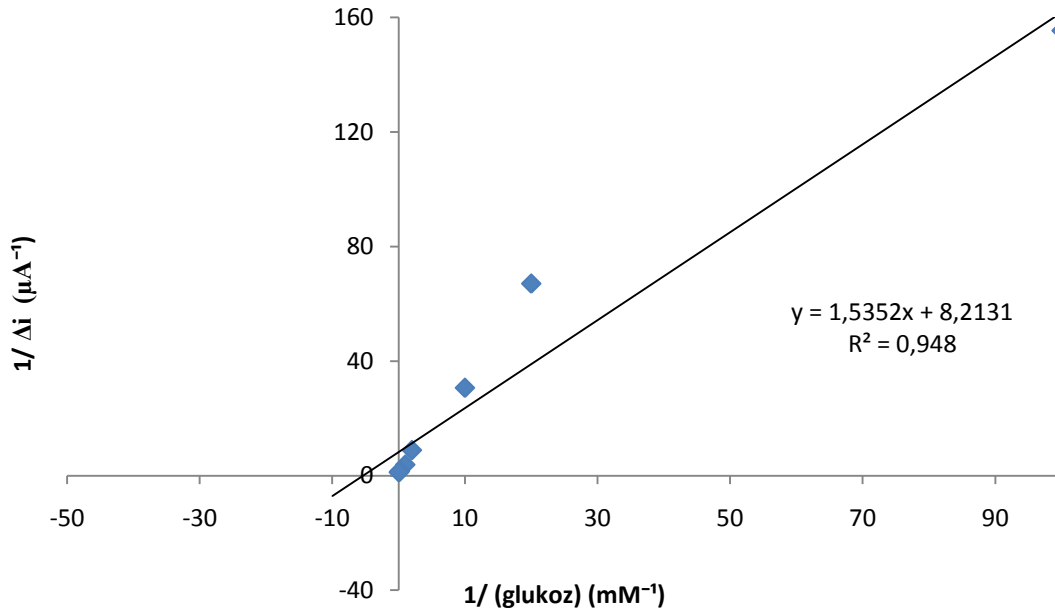
Şekil 4.12. Biyosensörün amperometrik cevabına glukoz derişiminin etkisi (0,1 M pH=7,5 fosfat tamponu, 25°C)

Şekil 4.12. incelendiğinde akımların belli bir derişime kadar doğrusal olarak arttığı daha sonra ise bu doğrusallıktan saptığı görülmektedir. Glukoz derişiminin $1,0 \times 10^{-2}$ M' dan yüksek olduğu durumlarda akım değerleri sabit kalmıştır. Bu da bize enzimin substrata doyduğunu gösterir.

Doğrusal bölgedeki glukoz derişimine karşı akım değişimi grafik Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Bu grafikte görülen eğrinin doğrusallığının ise oldukça iyi olduğu görülmektedir.



Şekil 4.13. Glukoz biyosensörünün kalibrasyon grafiği (0,1 M pH=7,5 olan fosfat tamponu, 25 °C)

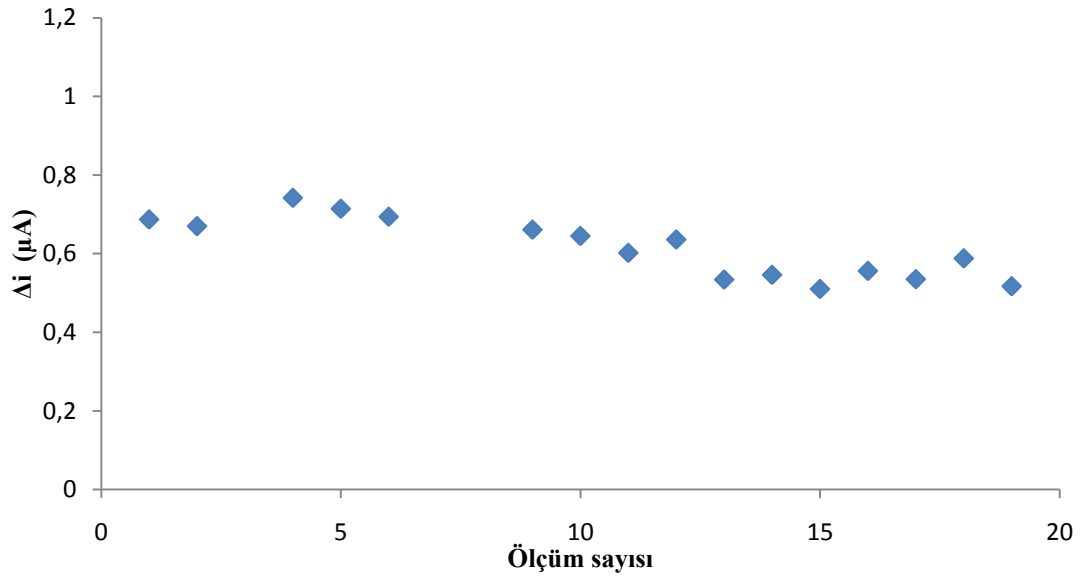


Şekil 4.14. Biyosensörün glukoz duyarlılığını gösteren Linewear-Burke grafiği

Enzimler için $K_{M(gözlenen)}$ ve $V_{maks(gözlenen)}$ sabitlerini bulmak amacıyla (1/glukoz derişimi)- $(1/\Delta i)$ grafiğı çizildi (Linewear Burk grafiğı) (Şekil 4.14). Bu eğrinin x eksenini kestiğı nokta $-1/K_M$ değerini bize verir. Buradan $K_{M(göz.)}$ değeri 0,186 mM olarak hesaplandı. y eksenini kestiğı noktadan yararlanarak $V_{maks(göz.)}$ değeri 0,121 olarak bulundu. K_M değeri enzimin substrata karşı olan ilgisini gösterir. Literatürlerde glukoz oksidaz enzimi için verilen $K_{M(göz.)}$ değerleri 11,9; 9,34; 18,0 mM' dır [8, 36, 39]. Bu durum kullandığımız enzimin kaynağının farklı olmasından enzimatik reaksiyonun gerçekleştiğı taşıyıcı ortamın farklılığından kaynaklanabilir.

4.4.4. Enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliğı

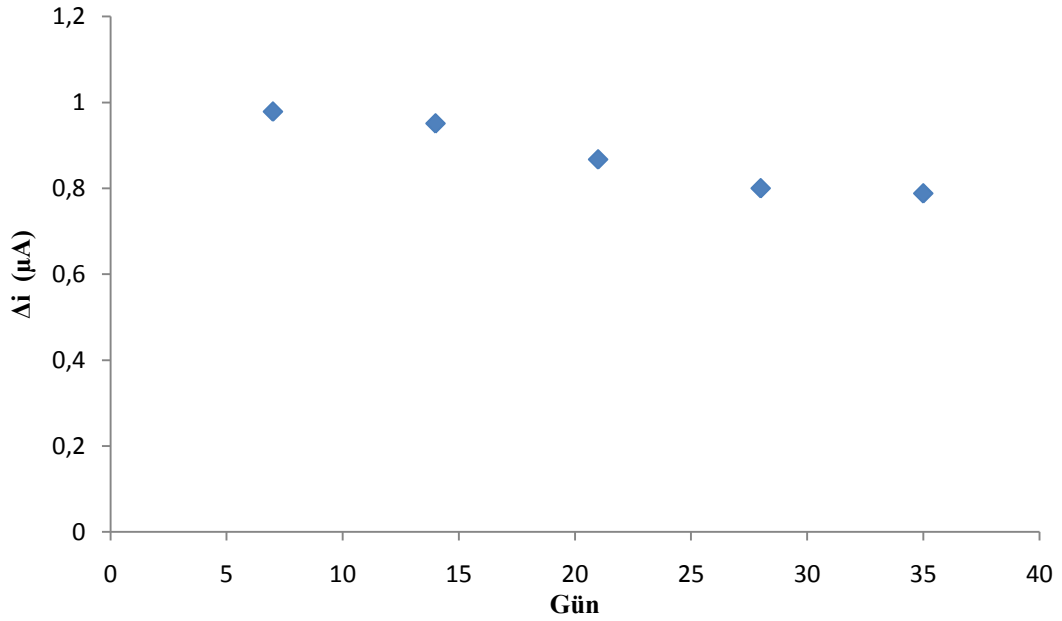
Bölüm 3.8.4'de belirtildiğı gibi hazırlanan enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliğı incelendi. Deneyler sonunda elde edilen amperometrik cevap akımları ölçme sayısına karşı grafiğı geçirildi (Şekil 4.15). Enzim elektrodun 16 ölçüm sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 75'ini koruduğı gözlenmiştir. Bu üç eğrinin eğimlerinin bağıl standart sapması %12,36 olarak bulundu.



Şekil 4.15. Enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1 M pH=7,5 olan fosfat tamponu, 25°C)

4.4.5. Raf ömrünün belirlenmesi

Enzim elektrodunda aranan en önemli özelliklerden biri de elektrodun uzun ömürlü olmasıdır. Bu amaçla enzim elektrodunun raf ömrünün belirlenmesi Bölüm 3.8.5' de anlatıldığı gibi yapıldı. Enzim elektrot +4 °C'de buzdolabında fosfat tamponu içinde bekletildi. Saklama süresine karşı akım değişimi değeri grafiğe geçirildi. (Şekil 4.16)



Şekil 4.16. Enzim elektrodunun raf ömrünün incelenmesi (0,1 M pH=7,5 olan fosfat tamponu, 25 °C)

Enzimlerin aktif merkezinin geometrik şeklinde sıcaklığın, havanın ve bazı kimyasal maddelerin etkisiyle değişiklikler meydana gelir. Enzimler kullanılmadıkları zaman uygun koşullarda muhafaza edilsin ya da edilmesin zamana karşı aktiflik kaybına uğrarlar. Serbest enzimlerde aktiflik kaybı immobilize enzimlere oranla daha fazladır.

$1,0 \times 10^{-5}$ M sabit glukoz derişimde yapılan çalışmada akım değişiminin ilk iki hafta çok az düştüğü görüldü. 35. günün sonunda biyosensörün başlangıç amperometrik cevabının %19,4'ünü kaybettiği görüldü.

Aynı zamanda enzim elektrodun buzdolabında bekletilmesi sürecinde, polimerden enzimin sızmadığı; ölçtüğümüz akım değerinin düşük çıkmasıyla anlaşıldı.

4.4.6. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler

Askorbik asidin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.8.6 da askorbik asidin girişim etkisine göre yapılan deneyler sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de verildi. Çizelge 4.2 incelendiğinde $1,0 \times 10^{-5}$ M askorbik asidin % 77,14 girişim etkisi olduğu Çizelge 4.2 de görülmektedir. Askorbik asidin girişim etkisini azaltmak için salata suyu ilavesi ve sıcaklık çalışması gerçekleştirildi. Salatalık suyu ilavesi sonunda askorbik asidin girişiminin %2 oranında azaldığı görüldü. Sıcaklık ile yapılan çalışmada ise askorbik asidin girişiminde herhangi bir azalma görülmemiştir.

Parasetamolün (asetaminofen) girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.8.6 da yapılan deneyler sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’ de gösterilmiştir. $1,0 \times 10^{-4}$ M parasetamol için girişim etkisi %37 olarak bulundu. $1,0 \times 10^{-5}$ M ve $1,0 \times 10^{-6}$ M derişimlerde girişim etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Parasetamolün $1,0 \times 10^{-4}$ M olan kandaki derişiminin 50 defa seyreltildiğinde parasetamolün girişim etkisinin görülmediği $1,0 \times 10^{-5}$ M ve daha düşük derişimlere indiği ve böylelikle girişim etkisinin seyreltme ile önlenebileceği söylenebilir.

Ürik asidin girişim etkisinin incelenmesi

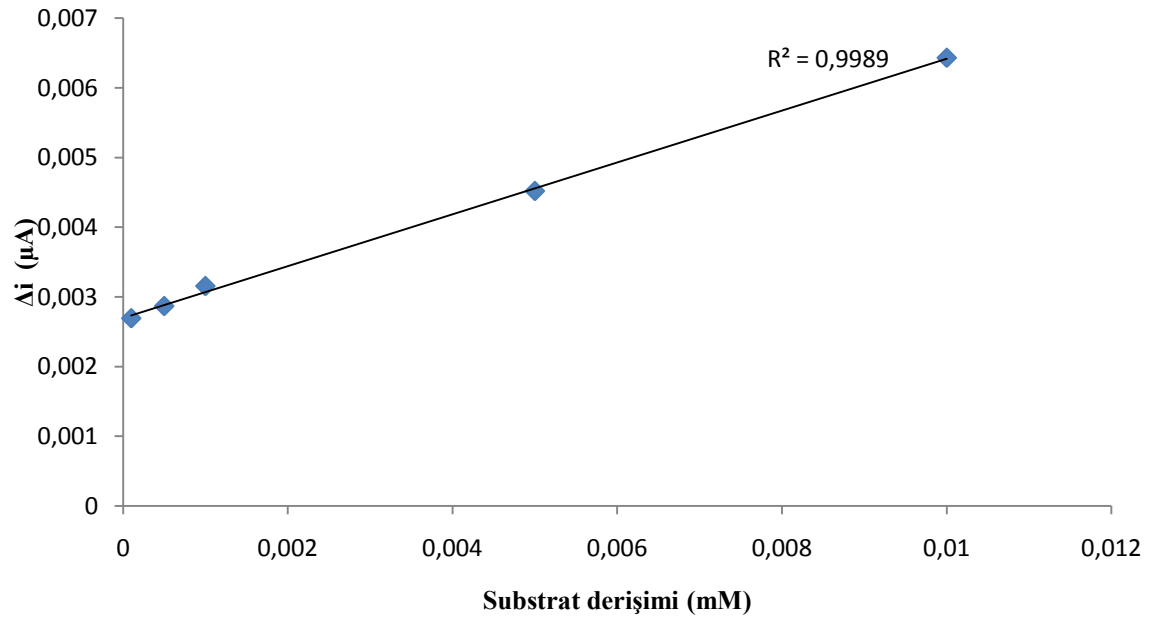
Ürik asidin kandaki normal değer aralığının üst sınırı olan $3,0 \times 10^{-4}$ M derişimde ürik asit için girişim etkisi %94,96 olarak bulundu.

Çizelge 4.2. Biyosensör üzerine ($1,0 \times 10^{-5}$ M glukoz derişiminde) girişim yapan maddeler ve girişim etkileri

Girişim yapan maddeler	Çalışılan derişimler (M)	Toplam cevap akımı(μ A)	Girişim yapan maddenin cevap akımı(μ A)	Girişim yapan maddenin cevap akımının toplam akıma oranı (%)
Askorbik asit	$1,0 \times 10^{-5}$	0,280	0,216	77,14
Parasetamol	$1,0 \times 10^{-5}$	0,010	0,0037	Girişim yok
Ürik asit	$3,0 \times 10^{-4}$	0,119	0,113	94,96

4.4.7. Biyolojik sıvıda (kanda) glukoz tayini

Biyolojik sıvı olan kan numunelerinde yapılan glukoz analizi sonunda ölçülen amperometrik cevap akımlarına karşı gelen derişim değerleri kalibrasyon grafiğı kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.17). Hesaplanan derişim değerleri Çizelge 4.3’de verildi.



Şekil 4.17. Glukoz biyosensörünün kalibrasyon grafiği (0,1 M pH=7,5 olan fosfat tamponu, 25 °C)

Çizelge 4.3. Kan numunelerinde hesaplanan glukoz derişimleri

Kan numunesi	Hesaplanan Sonuçlar (mg/100mL)	Hastane Sonuçları (mg/100mL)
1	190	82,7
2	184,5	103
3	170	86,7

Sonuç olarak; bu çalışmada hazırladığımız glukoz biyosensörünün;

- Doğrusal çalışma aralığı oldukça geniştir ($1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M).
- Tekrar kullanılabilirliği iyidir (16 ölçme sonunda biyosensörün aktivitesini %75 oranında koruduğu görülmüştür).
- Raf ömrü uygundur (5 hafta sonunda başlangıç amperometrik cevabının yaklaşık %19,4' ünü kaybettiği görülmüştür).
- Polianilin-polivinil sülfonat filmle yapılan biyosensördeki immobilize enzime ait gözlenen $K_{M(gözlenen)}$ değeri 0,186 ve $V_{maks(gözlenen)}$ değeri 0,121 olarak bulundu.
- Hazırlanan glukoz elektrodunun tekrarlanabilirliği oldukça iyidir. Bu elektrot çok miktarda glukoz ölçümleri için uygundur. Fakat ürik asit ve askorbik asidin girişimleri oldukça yüksektir. Bu büyük bir problemdir. Girişim etkileri üzerine yapılan literatür araştırmasında polianilin filmin kullanıldığı bir çalışmada özellikle ürik asit ve askorbik asidin çok büyük bir girişim etkisinin olduğu ve bu girişiminde filmin özelliğinden dolayı giderilemediği belirtilmektedir [6].

Bu konudaki öneriler;

1)Ürik asidin girişim etkisi, ölçümden önce ürikaz enzimi kullanılarak giderilebilir. Yine aynı şekilde askorbik asidin etkisi de, askorbat oksidaz kullanarak giderilebilir.

2)Hazırlanan polianilin-polivinilsülfonat filme medyatör katılarak çalışma potansiyeli daha da düşürülebilir.

- Hazırlanan biyosensör ile biyolojik sıvılarda var olan ve girişim etkisi yapabilecek maddelerden askorbik asidin girişim etkisinin, biyolojik örnekleri seyreltme veya salatalık suyu ilavesi ile önleendiği ve ürik asit analizi sırasında herhangi bir girişiminin gözlenmediği söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Olsan, A., "Glucose and glucose containing syrups", Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, **VCH Publishers**, New York, A. 12: 457-475 (1991).
2. Alegret, S., Dominguez, C., Munoz, J., "Glucose biosensors based on a reagentless graphite-epoxy screen-printable biocomposite", **Sensors and Actuators B**, 45: 55-62 (1997).
3. Spichiger-Keller, U.E., "Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications", **Verlog Chemie**, Weinheim, 455 (1998).
4. Kılınç, E., "Enzime dayalı elektrokimyasal biyosensörlerin mediyatör kullanarak tasarımı", **Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, 26 (1996).
5. Sljukia, B., Banks, C.E., Salter, C., Crossiey, A., "Electrochemically polymerized composites of multi walled carbon nanotubes and poly(vinylferrocene) and their use as modified electrodes", **Application to glucose sensing**, Analyst, 131: 670-677 (1995).
6. Garjonyte, R., Malinauskas, A., "Amperometric glucose biosensors based on Prussian Blue-polyaniline-glucose oxidase modified electrodes", **Biosensors and Bioelectronics**, 15: 445-451 (2000).
7. Gaikwad, P.D., Shirale, D.J., Gade, V.K., Savale, P.A., Kharat, H.J., Kakde, K.P., Shirsat, M.D., "Immobilization of GOD on electrochemically synthesized PANI film by cross-linking via glutaraldehyde for determination of glucose", **Int. J. Electrochem. Sci.**, 1: 425-434 (2006).
8. Xue, H., Shen, Z., Li, Y., "Polyaniline-polyisoprene composite film based glucose biosensor with high permselectivity", **Synthetic Metals**, 124: 345-349 (2001).
9. Gaikwad, P.D., Shirale, D.J., Savale, P.A., Datta, K., Ghosh, P., Shirsat M.D., "Development of PANI-PVS-GOD electrode by potentiometric method for determination of glucose", **Int. J. Electrochem. Sci.**, 2:488-497 (2007).
10. Yang, X., Zhaou, Z., Xiao, D., Choi, M.F., "A fluorescent glucose biosensor based on immobilized glucose oxidase on bamboo inner shell membrane", **Biosensors and Bioelectronics**, 21: 1613-1620 (2006).

11. Xu, Y., Zhang, X., Yu, H., Clen, H., "A stable glucose biosensor prepared by co-immobilizing glucose oxidase into poly(p-chlorophenol) at a platinum electrode", **Fresenius J. Anal. Chem.**, 369: 486-490 (1999).
12. Arnold, S., Donnert, C., "Directed evolution of industrial enzymes", **Trens in Biotechnology**, 17: 135-136 (1999).
13. Telefoncu, A., "İmmobilize Enzimler", Enzimoloji, **Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu**, Kuşadası, 1-2-3-4-9 (1999).
14. Özyılmaz, G., "Glukoz oksidaz ve katalazın ayrı ayrı ve birlikte immobilizasyonu ve karakterizasyonu", **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana, 11-14 (2005).
15. Weibel, M.K., Brights, H.J., "The glucose oxidase mechanism, interpretation of the pH dependence", **The Journal of Biological Chemistry**, 246(9): 2734-2744 (1971).
16. Spichiger-Keller, U.E., "Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications", **Verlag Chemie**, Weinheim, 455 (1998).
17. Telefoncu, A., "Biyosensörlere genel bakış", **Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu**, Kuşadası, 1-2-3-4-5-6-7-8 (1999).
18. Arslan, F., "Ksantin tayini için polipirol filme ksantin oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması", Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 31-42 (2004).
19. Sarıçiftçi, N.S., Smiloritz, L., Heeger, A.J., Wudl, F., "Photoinduced electron-transfer from a conducting polymer to buckminsterfullerene", **Science**, 258: 1474-1476 (1992).
20. Roncali, J., "Conjugated poly(thiophenes)-synthesis, functionalization and applications", **Chem. Rev.**, 711-738 (1992).
21. Genies, E.M., Tsintavis, C., "Redox mechanism and electrochemical behavior of polyaniline deposits", **J. Electroanalytical Chemistry**, 109-128 (1985).
22. Akbulut, U., "İletken polimerlerle transduser hazırlanması", Biyosensörler, **Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu**, Kuşadası, 10-14-16-52-54 (1999).
23. Telefoncu, A., "Biyoreseptörlerin immobilizasyonu", **Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu**, Kuşadası, 42-51-53 (1999).

24. Dumitriu, S., Papu, M., "Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers", **J. Bioact. Compat. Pol.**, 3: 243-312 (1988).
25. Gerharts, W., "Enzyme in industry", Production and applications, **UCH Velosgesellschaft Mblt**, Weinheim, 35-43 (1990).
26. Dinçkaya, E., "Enzim sensörleri", **Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu**, 81-142 (1999).
27. Telefoncu, A., "Enzim sensörleri", **Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu**, Kuşadası, 91 (1998).
28. Kılınç, M.E., "Enzyme dayalı elektrokimyasal biyosensörlerin mediyatör kullanarak tasarımı", **Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, 9-10 (1996).
29. Saito, T., Watanabe, M., "Characterization of poly(vinylferrocene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) for use as electron mediator in enzymatic glucose sensor", **Reactive and Functional Polymers**, 37: 263-269 (1997).
30. Vidal, J.C., Garcia, E.R., Castillo, J.R., "In situ preparation of over oxidized PPy/oPPD bilayer biosensor for determination of glucose and cholesterol in serum", **Sensors and Actuators**, 57: 219-226 (1999).
31. Yang, X., Hua, L., Gong, H., Tan, S., "Covalent immobilization of an enzyme (glucose oxidase) onto a carbon sol-gel silicate composite surface as a biosensing platform", **Analytica Chimica Acta**, 478: 67-75 (2002).
32. Sung, W., Bae, Y., "A glucose oxidase electrode based on polypyrrol with polyanion/PEG/enzyme conjugate dopant", **Biosensors and Bioelectronics**, 18: 1231-1239 (2002).
33. Li, T., Yao, Z., Ding, Liang., "Development of an amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized through silica sol-gel film onto Prussian Blue modified electrode", **Sensors and Actuators B**, 101: 155-160 (2004).
34. Pan, X., Kan, J., Yuan, L., "Polyaniline glucose oxidase biosensor prepared with template process", **Sensors and Actuators B**, 102: 325-330 (2004).
35. Luo, X., Xu, J., Du, Y., Chen, H., "A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by

- one-step electrodeposition", *Analytical Biochemistry*, 334: 284-289 (2004).
36. Zhou, H., Chen, H., Luo, S., Chen, J., Wei, W., "Glucose biosensor based on platinum microparticles dispersed in nano-fibrous polyaniline", *Biosensors and Bioelectronics*, 20: 1305-1311 (2005).
 37. Grennan, K., Killard, A.J., Hanson, J.C., Cafolla, A., Smyth M.R., "Optimisation and characterisation of biosensors based on polyaniline", *Talanta*, 68: 1591-1600 (2006).
 38. Xian, Y., Hu, Y., Liu, F., Xian, Y., Wang, H., Jin, L., "Glucose biosensor based on Au nanoparticles-conductive polyaniline nanocomposite", *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 1996-2000 (2006).
 39. Shan, D., Wang, S., He, Y., Xue, H., "Amperometric glucose biosensor based on in situ electropolymerized polyaniline/poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) composite film", *Materials Science and Engineering C*, 28: 213-217 (2008).
 40. Xu, L., Zhu, Y., Yang, X., Li, C., "Amperometric biosensor based on carbon nanotubes coated with polyaniline/dendrimer-encapsulated Pt nanoparticles for glucose detection", *Materials Science and Engineering C*, 29: 1306-1310 (2009).
 41. Hailing, C., Li, Z., Xi, C., Zhi Xia, Z., Xia Ru, W., "Development of an amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase in an ormosil-PVA matrix onto a Prussian Blue modified electrode", *Science in China Series B*, 8: 1128-1135 (2009).
 42. Qiong, C., Tuzhi, P., "Silk fibroin/cellulose asetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination or fish freshness", *Analytica Chimica Acta.* , 369: 245-251 (1998).
 43. Horng, Y., Hsu, Y., Ganguly, A., Chen, C., Chen, L., Chen, K., "Direct-growth of polyaniline nanowires for enzyme-immobilization and glucose detection", *Electrochemistry Communications*, 11: 850-853 (2009).
 44. Pınarbaşı, Z.A., "Ürikaz enziminin polipirrol-polivinilsülfonat filme immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması", *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 52-53 (2009)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : USTABAŞ, Selvin

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 25.07.1984 / RİZE

Medeni hali : Bekar

e-mail : selvin_kmy@hotmail.com.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	2010
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi/ Kimya Öğretmenliği	2008
Lise	Arhavi Lisesi	2002

Yabancı Dil

İngilizce