

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KISA, ORTA VE UZUN DÖNEM KAN ŞEKER ÖLÇÜMLERİNİ EŞ
ZAMANLI GERÇEKLEŞTİREN YENİ BİR ÖLÇÜM YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Duygu ÜNER BAHAR

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK

Eş Danışman

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Ağustos, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KISA, ORTA VE UZUN DÖNEM KAN ŞEKER ÖLÇÜMLERİNİ EŞ
ZAMANLI GERÇEKLEŞTİREN YENİ BİR ÖLÇÜM YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Duygu ÜNER BAHAR tarafından hazırlanan tez çalışması 01/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Fatih ÇOLDUR, Üye

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

Doç. Dr. Rabia Çakır KOÇ, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Zafer Ömer ÖZDEMİR, Üye

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Kısa, Orta ve Uzun Dönem Kan Şeker Ölçümlerini Eş Zamanlı Gerçekleştiren Yeni Bir Ölçüm Yöntemi Geliştirilmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Duygu ÜNER BAHAR

İmza



Bu alışma, “TUBİTAK 1001 116S758 Numaralı Projesi” ve “TUBİTAK 2211C Öncelikli Alanlar Doktora Bursu” ile desteklenmiştir.



Değerli eşime
ve
biricik kızıma

TEŞEKKÜR

Doktora yapmak bana göre bilimsel yetkinlik edinmenin yanında biraz da motivasyon işi. Bu motivasyonu sağlamamda çevremdeki insanların payı da büyük kuşkusuz. Dolayısıyla tezimi büyütürken aldığım destekleri asla yadsıyamam. Şüphesiz tek başıma asla bu sonuca erişemezdim. Öncelikli olarak üniversite hayatım boyunca bilimsel desteğini esirgemeyen, bana karşı her zaman sonsuz sabrını gösteren değerli hocam Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Ayrıca lisans eğitimimden bu yana yardımlarını esirgemeyen ve doktora tezimin de eş danışmanı olan değerli hocam Doç.Dr. Didem ÖZÇİMEN'e de desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan, beni büyüten ve bana eğitim olanakları sunan annem Nejla ÜNER, babam Yalçın ÜNER ve biricik kardeşim Samet ÜNER'e çok teşekkür ederim.

Artık benim de ailem olan doktora çalışmam boyunca her zaman yanımda olan ve beni çokça destekleyen ikinci ailem Sabriye BAHAR ve Mümin BAHAR'a yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Ve tabiki hayatımın olmazsa olmazları değerli eşim Hüseyin BAHAR ve biricik kızım Beyza BAHAR'a doktora çalışmamı tamamlayabilmem için benimle geçirecekleri zamandan çokça feragat ettikleri ve yoluma devam edebilmem için beni her zaman motive ettikleri için çok teşekkür ederim.

Son olarak labaratuvarıda birlikte çalıştığım yardımlarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma da desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin tüm araştırmacılara yardımcı olmasını içtenlikle diliyorum.

Duygu ÜNER BAHAR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	IX
KISALTMA LİSTESİ	XI
ŞEKİL LİSTESİ	XII
TABLO LİSTESİ	XVI
ÖZET	XVII
ABSTRACT	XX
1 Giriş	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	4
1.3 Hipotez.....	4
2 Glikozile Protein Ölçüm Yöntemleri ve Standardizasyonu	6
2.1 Glikozile Hemoglobin (HbA1c)	6
2.2 HbA1c ve Borat İlgisi.....	9
2.3 HbA1c Ölçüm Yöntemleri	10
2.3.1 Yerinde Ölçüm Yöntemleri (Biyosensörler)	12
2.3.2 Laboratuvar Ölçüm Yöntemleri	19
2.4 g-HSA Proteinini ve Ölçüm Yöntemleri.....	22
2.5 HbA1c Standardizasyonu.....	23
3 Potansiyometrik Analiz	26
3.1 Potansiyometri	26
3.2 Potansiyometrik Tayin.....	27
3.3 Referans Elektrotlar	29

3.4 İyon Seçici Elektrotlar	31
3.5 İyon Seçici Elektrotların Performans Özellikleri.....	34
3.6 İyon Seçici Elektrot Uygulamaları	36
4 Akış Enjeksiyon Analizi (FIA)	38
4.1 Akış Enjeksiyon Analizi.....	38
4.2 Akış Enjeksiyon Sisteminin Çalışma Prensipleri.....	41
4.3 Dağılım Katsayısı ve Dağılımı Etkileyen Faktörler	42
4.4 Reaksiyon/Ayrım Kolonu ve Tipleri.....	46
5 Materyal ve Metod	47
5.1 Materyal	47
5.1.1 Kullanılan Kimyasallar	47
5.1.2 Kullanılan Cihazlar	48
5.2 Metod.....	49
5.2.1 Karbon Nano Tüp-Gümüş Borat (CNT-GB) Temelli Kompozit Borat Elektrotların Hazırlanması.....	50
5.2.2 Standart Glikoz, g-HSA ve HbA1c Çözeltilerinin Hazırlanması.....	52
5.2.3 Kolon Dolgu Maddesinin Hazırlanması.....	53
5.3 Çalışma Yöntemi.....	53
6 Bulgular ve Tartışma	55
6.1 Durgun Ortam Çalışmaları	55
6.1.1 CNT-GB Elektrotlar İle Durgun Ortam Çalışmaları.....	55
6.1.2 CNT-GB Kompozit Elektrotların Potansiyometrik Performans Özellikleri.....	58
6.1.3 Durgun Ortamda Standart Çözeltilere Karşı Alınan Potansiyometrik Yanıtlar	67
6.2 Hareketli Ortam Çalışmaları.....	69

6.2.1	CNT-GB Kompozit Elektrotların Hareketli Ortam Çalışmaları	69
6.2.2	Akış Enjeksiyon Sistemde Standart Çözeltilere Karşı Alınan Potansiyometrik Yanıtlar	76
6.2.3	Akış Enjeksiyon Sisteme Ayrım/Reaksiyon Kolonu Eklenmesi	84
6.2.4	Akış Enjeksiyon Sistemde Standart Glikoz- g-HSA ve HbA1c'nin Eş Zamanlı Ölçümü.....	86
6.2.5	Akış Enjeksiyon Sistemde Seruma Standart ilavesi ile Yapılan Eş zamanlı Potansiyometrik Ölçümler	92
6.3	Elektrot Ve Kolon Dolgu Malzemesinin XRD, FTIR VE SEM Analizleri	97
7	Sonuç Ve Öneriler	104
	Kaynakça	107
	Tezden Üretilmiş Yayınlar	116

SİMGELİSTESİ

μl	Mikrolitre
M	Molarite
E	Elektrot potansiyeli
ml	Mililitre
mV	Milivolt
R	Gaz Sabiti: 8.314 J/mol K
F	Faraday Sabiti: 96.500 Coulomb/mol
T	Mutlak Sıcaklık: 298 K
z	Ana iyon yükü

KISALTMA LİSTESİ

ADAG	A1C- Derived Average Glucose (A1c-Türetilmiş Ortalama Glikoz)
APBA	3-Aminofenil Boronik Asit
CNT	Karbon Nano Tüp
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial (Diyabet Kontrolü ve Komplikasyonları Testi)
DOCA	Deoksikolik Asit
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
FIA	Flow Injection Analysis (Akış Enjeksiyon Analizi)
FPBA	Formilfenilboronik Asit
FcBA	Ferrosenboronik Asit
GB	Gümüş Borat
GAP	Glikozile Albumin Proteini
GLUT4	Glukoz Taşıyıcı Tip 4
GO	Grafit Oksit
GOx	Glikoz Oksidaz
GPP	Glikozile Pentapeptid
GSP	Glikozile Serum Proteini
Hb	Hemoglobin
HbA1c	Hemoglobin A1c
Hbs	HbA ve HbA1c Toplamı
HCF	Heksasiyanoferrat
Hp	Haptoglobin
HSA	Human Serum Albumin (İnsan Serum Albümini)

IFCC	Intarnational Federation of Clinical Chemistry (Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu)
IgG	İmmünoglobulin
ISE	İyon Seçici Elektrot
MIC	Moleküler Baskı Katalizörü
MIP	Moleküler Baskılı Polimer
MPA	Merkaptopropiyonik Asit
NGSP	National Glucose Standardization Program (Ulusal Glikoz Standardizasyon Programı)
NP	Nanotabaka
PTFE	Politetrafloroetilen
pTTBA	Politeriyofenbenzoik Asit
PVA-SbQ	Stilbazol İle Çapraz Bağlanmış Polivinilalkol
RMP	Referans Ölçüm Prosedürü
SAM	Kendinden Montajlı Tek Tabaka
T3BA	Tiyofen-3-Boronik Asit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1 Diyabet tipleri (Tip1 ve tip 2)	2
Şekil 2. 1 Glikozile hemoglobinin iki aşamalı enzimatik olmayan reaksiyon gösterimi (Sırasıyla glikoz, schiff bazı, amadori ürünü).....	7
Şekil 2. 2 Jel elektrodaklama ile kan hücresi hemoglobin komponentlerinin ayrılması	8
Şekil 2. 3 Borat ($B_4O_7^{2-}$) 2D moleküler görünümü	9
Şekil 2. 4 Borat ve HbA1c bağlanması.....	10
Şekil 2. 5 HbA1c ölçüm yöntemleri sınıflandırması	11
Şekil 2. 6 Boronik asit bazlı HbA1c sensör yapımında (A)FcBA, (B)T3BA, (C) APBA/FTBA kullanılarak HbA1c tanınması	14
Şekil 2. 7 HbA1c imminosensörü yapımında (A) deoxycholic acid (DOCA) veya Hp, (B)Glikozile pentapeptid (GPP), (C) 3-MPA, PPy-Au Nps ve SAM karışımı kullanılarak HbA1c tanınması.....	16
Şekil 2. 8 Dolaylı HbA1c biyosensörü yapımında (A)PVA-SbQ veya NP tutturulmuş elektrot yüzeyi, (B)MIC metodu, (C) enzimatik olmayan metod kullanılarak fruktozil valin tanınması	18
Şekil 2. 9 HbA1c ölçüm yöntemlerinin analitik kavramları ve bunların Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu- referans ölçüm prosedürü (IFCC-RMP) ile izlenebilirliği.....	20
Şekil 2. 10 Serum proteini (albumin).....	23
Şekil 3. 1 Potansiyometrik sistem elemanları	27
Şekil 3. 2 Gümüş/Gümüş klorür referans elektrot.....	30
Şekil 3. 3 Potansiyel ölçümü için tasarlanmış bir elektrokimyasal hücre örneği	32
Şekil 3. 4 Akış enjeksiyon sistemde kullanılan tipik bir akış hücresi	37
Şekil 4. 1 Akış enjeksiyon sisteminde numunenin aldığı yol.....	39
Şekil 4. 2 Tipik akış enjeksiyon analiz sistemi elemanları	40
Şekil 4. 3 Örnek bir dedektör kaydı	42
Şekil 4. 4 Dağılma tipleri.....	43
Şekil 4. 5 Farklı akış hızlarının dağılmaya etkisi.....	44
Şekil 4. 6 Farklı numune hacimlerinin numune bandındaki dağılmaya etkisi	45
Şekil 4. 7 Akış yolu uzunluğunun numune bandındaki dağılmaya etkisi	45
Şekil 4. 8 Ayrım/Reaksiyon kolonu tipleri.....	46
Şekil 5. 1 Geliştirilen akış enjeksiyon analiz sisteminin genel görünümü.....	49

Şekil 5. 2 Kompozitlerin sıkıştırılması için kullanılan mengene	51
Şekil 5. 3 Kompozitlerin bakır tele katı kontakt ile tutturularak elektrot haline getirilmesi	52
Şekil 6. 1 102 Nolu kompozisyon ile hazırlanan elektrot serisinin B4O7 ²⁻ iyonlarına karşı sergilediği potansiyometrik yanıt.....	58
Şekil 6. 2 112 Nolu elektrotun seçicilik katsayısı belirlenirken alınan potansiyometrik ölçüm örneği	59
Şekil 6. 3 Borat seçici elektrotun standart anyon çözeltilerine karşı sergilediği potansiyometrik cevaplar	60
Şekil 6. 4 Seçicilik katsayısı hesabında kullanılan kalibrasyon grafiği.....	60
Şekil 6. 5 Geliştirilen 112 nolu kompozit borat seçici elektrotların tayin limiti	62
Şekil 6. 6 88 nolu elektrotun cevap zamanını gösteren grafik.	63
Şekil 6. 7 102 Nolu elektrotun tekrarlanabilirlik testi	64
Şekil 6. 8 5 ay sonunda 102 nolu elektrotların potansiyometrik performansları ...	65
Şekil 6. 9 102 nolu CNT-GB elektrotların pH çalışma aralığı	65
Şekil 6. 10 CNT-GB elektrotların durgun fazda doğrusal çalışma aralığı ve kalibrasyon grafiği	66
Şekil 6. 11 Durgun ortamda borat çözeltisine g-HSA eklenerek alınan potansiyometrik yanıt.....	67
Şekil 6. 12 Durgun ortamda 5×10^{-3} M borat çözeltisine 1×10^{-2} glikoz eklenerek alınan potansiyometrik yanıt	68
Şekil 6. 13 Durgun ortamda HbA1c'ye karşı alınan potansiyometrik yanıt	69
Şekil 6. 14 Akış enjeksiyon için tasarlanan çeşitli akış hücreleri	70
Şekil 6. 15 Akış hücrelerinin sızdırmazlık testi.....	70
Şekil 6. 16 Akış Enjeksiyon sistemde kullanılan akış hücresinin dedektör bölmesi	71
Şekil 6. 17 Akış hücresinin valfe ve harekeli faza bağlı numune enjeksiyon bölmesi	71
Şekil 6. 18 Çalışmada kullanılan akış enjeksiyon analiz sistemi 2 parçalı akış hücresi	72
Şekil 6. 19 Akış enjeksiyon sistemde akış hızı ve enjeksiyon hacmi optimizasyonu ölçümlerinden bir örnek.....	73
Şekil 6. 20 Akış enjeksiyon sistemde CNT-GB elektrotların değişen B4O7 ²⁻ iyon konsantrasyonlarına karşı sergilediği potansiyometrik cevaplar	74
Şekil 6. 21 CNT-GB kompozit elektrotların akış enjeksiyon sistemindeki doğrusal çalışma aralığı	74

Şekil 6. 22 CNT-GB elektrotların akış enjeksiyon sistemindeki kalibrasyon grafiği	75
Şekil 6. 23 CNT-GB kompozit elektrotların akış enjeksiyon sistemde tekrarlanabilirlik çalışması.....	76
Şekil 6. 24 Akış enjeksiyon sistemde ayırım kolonu kullanılmadan glikoz-g-HSA-HbA1c enjeksiyonu ile alınan potansiyometrik yanıt.....	77
Şekil 6. 25 Standart glikoz çözeltilerinin akış enjeksiyon sisteme enjekte edilmesi ile alınan potansiyometrik yanıt	77
Şekil 6. 26 CNT-GB elektrotun glikoz ölçümünde tekrarlanabilirliği	78
Şekil 6. 27 CNT-GB kompozit elektrotların akış enjeksiyon analiz sistemindeki glikoza karşı doğrusal çalışma aralığı ve kalibrasyon grafiği.	79
Şekil 6. 28 CNT-GB elektrotun farklı konsantrasyonlarda HbA1c'ye verdiği potansiyometrik yanıt.....	80
Şekil 6. 29 CNT-GB-borat kompozit elektrotların akış enjeksiyon analiz sistemindeki HbA1c'ye karşı doğrusal çalışma aralığı ve kalibrasyon grafiği.	82
Şekil 6. 30 Akış enjeksiyon sistemde farklı konsantrasyonlarda g-HSA enjeksiyonu sonucu alınan potansiyometrik yanıt.....	82
Şekil 6. 31 G-HSA kalibrasyon eğrisi ve doğrusal çalışma aralığı grafiği	84
Şekil 6. 32 Çalışmada kullanılan ayırım kolonu.....	85
Şekil 6. 33 Akış enjeksiyon sisteme ayırım kolonunun yerleştirilmesi	86
Şekil 6. 34 CNT-GB elektrotun glikoz-g-HSA-HbA1c'ye ve 1×10^{-1} M borata verdiği potansiyometrik yanıt.....	88
Şekil 6. 35 Glikoz-g-HSA- HbA1c'nin kolonda ayrışmaları sonucu eş zamanlı ölçüm. CNT-GB elektrotun akış hızı 30µl/s iken glikoz-g-HSA-HbA1c'ye verdiği potansiyometrik yanıt.....	88
Şekil 6. 36 Akış hızı 40 µl/S iken alınan potansiyometrik sonuç.....	89
Şekil 6. 37 Akış hızı 30 µl/s iken alınan potansiyometrik sonuç	89
Şekil 6. 38 Akış hızı 25 µl/s iken alınan potansiyometrik sonuç	90
Şekil 6. 39 Akış hızı 15 µl/s iken alınan potansiyometrik sonuç	90
Şekil 6. 40 Akış hızı 5 µl/s iken alınan potansiyometrik sonuç.....	91
Şekil 6. 41 Akış enjeksiyon sisteme sadece serum enjeksiyonu yapılarak alınan potansiyometrik yanıt.....	92
Şekil 6. 42 Serumdan sonra sisteme glikoz enjeksiyonu yapılarak alınan potansiyometrik yanıt.....	93
Şekil 6. 43 Akış enjeksiyon sistemde farklı akış hızlarında (20 µl/s altı) seruma standart ilavesi ile alınan potansiyometrik sonuçlar	93

Şekil 6. 44 Akış enjeksiyon sistemde seruma standart ilavesi ile alınan optimum tekrarlı potansiyometrik sonuç (25 µl/s).....	94
Şekil 6. 45 Kalibrasyon grafiği üzerinde glikoz konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi	95
Şekil 6. 46 Kalibrasyon grafiği üzerinde g-HSA konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi	95
Şekil 6. 47 Kalibrasyon grafiği üzerinde HbA1c konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi	96
Şekil 6. 48 CNT-GB kompozitinin XRD difraktogramı.....	97
Şekil 6. 49 CNT-GB kompozit FTIR analizi.....	99
Şekil 6. 50 Kolon dolgu malzemesi FTIR analizi	99
Şekil 6. 51 CNT-GB kompozit elektrotun SEM görüntüleri.....	100
Şekil 6. 52 CNT-GB kompozit elektrotun SEM görüntüleri.....	101
Şekil 6. 53 Kolon dolgu malzemesi SEM görüntüleri.....	102
Şekil 6. 54 Kolon dolgu malzemesi SEM görüntüsü	103

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 HbA1c'ye dayalı diyabet ve prediyabet teşhisinde kabul edilen sınır değerler	24
Tablo 6. 1 CNT-GB kompozit elektrot kompozisyonları	55
Tablo 6. 2 CNT-GB kompozit elektrotların farklı anyonların değişen derişimlerine karşı sergilediği potansiyel değerleri	61
Tablo 6. 3 Borat seçici elektrotların seçicilik katsayıları (Ayrı çözelti metodu)	61
Tablo 6. 4 Akış Enjeksiyon Sistemde CNT-GB elektrotun glikoz pik yükseklik değerleri.....	79
Tablo 6. 5 Akış enjeksiyon sistemde CNT-GB elektrotun verdiği HbA1c pik yükseklik değerleri	81
Tablo 6. 6 Akış enjeksiyon sistemde CNT-GB elektrotun verdiği g-HSA pik yükseklik değerleri	83
Tablo 6. 7 Şekil 6.44'deki ölçümün kalibrasyon grafikleri kullanılarak hesaplanan miktar tayinleri	97
Tablo 6. 8 CNT-GB kompozitinin XRD verileri.....	98

Kısa, Orta Ve Uzun Dönem Kan Şeker Ölçümlerini Eş Zamanlı Gerçekleştiren Yeni Bir Ölçüm Yöntemi Geliştirilmesi

Duygu ÜNER BAHAR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK

Eş-Danışman: Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Diyabet metabolik bir hastalıktır ve hastalığa ait komplikasyonların ilerlemesini önlemek için düzenli glisemik kontrol gereklidir. Glisemik kontrol, günlük açlık şekeri ölçümleri ile veya glikozillenmiş proteinlerin ölçülmesi ile sağlanır. Ancak açlık şekeri ölçümleri, o anki glisemik düzeyi yansıtır ortalama glikoz düzeyi hakkında bilgi vermemektedir. Glikolize-hemoglobin (HbA1c) ve fruktozamin gün içinde açlık-tokluk, egzersiz ya da kan glikozundaki geçici değişikliklerden etkilenmeden geriye dönük kan glikoz düzeyi hakkında bilgi veren önemli parametrelerdir.

Son 30 yılda HbA1c için çok sayıda ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar HbA0 ile HbA1c arasındaki yük farkına dayalı HPLC ile yapılan kromatografik yöntemler, yapısal farka dayalı fenilboronik asit-HbA1c ilişkisine dayalı kromatografik yöntemler, antijen-antikor ilişkisine dayalı immünokimyasal testlerdir.

Kromatografik yöntemlerde kullanılan yöntemler pahalı, çok sayıda ön prosedür ve profesyonel kullanıcı gerektiren yöntemlerdir. İmmüno kimyasal testlerde ise lineer olmayan kalibrasyon eğrileri ve çok kolay bozulabilen ayıraçlar sorun oluşturmaktadır.

Glisemik kontrolde kullanılan önemli bir diğer protein ise serum albüminidir. Serum albümini, HbA1c ölçümlerinin hemoglobin varyantlarından etkilendiği durumlarda, anemi veya böbrek yetmezliği durumlarında güvenilir olarak kullanılmaktadır. İnsan serum albumininin (HSA) kanda yarılanma ömrü 12-21 gün olduğu için g-HSA ölçümleri ile son 2-3 haftaya ait glikoz düzeyi ölçülebilmektedir. Bu ara ölçüm, henüz HbA1c yükselmeden önlem alınmasını sağlayabilmektedir. G-HSA ölçümünde kullanılan temel yöntemler boranat affinite kromatografisi, imünoassay teknikleri ve enzimatik yöntemlerdir. Son 15-20 yıl içerisindeki çalışmalar yoğun olarak glikozile albümin ve fruktozamin gibi 2-4 haftalık şeker düzeyini gösteren plazmadaki şeker belirteçleri üzerine yoğunlaşmıştır.

Bu çalışma glikoz, glikozile albümin ve glikozile hemoglobin ölçümünü aynı anda gerçekleştiren akış enjeksiyon analiz yöntemin geliştirilmesini konu almaktadır. Akış enjeksiyon analiz yönteminde, borat seçici sensör içeren bir deteksiyon bölmesi ve sınırlı ayırım sağlayan bir mini-kolon bulunmaktadır. Geliştirilen yöntem ile glikoz, glikozile albümin ve glikozile hemoglobinin eşzamanlı olarak ölçülmesi sağlanmaktadır.

Üç parametreyi birlikte ölçen bir yöntem veya cihaz literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışma ile hedeflenen eşzamanlı ölçüm yöntemi; ekonomik ve basittir. Aynı zamanda ön işlem olarak sadece kan örneğinin santrifüj ve lizis yapılmasını gerektirmektedir.

Çalışmada, uzun dönem glisemik kontrolleri için HbA1c'nin, orta dönem glisemik düzeyi için g-HSA'nın ve kısa dönem için anlık şeker ölçümlerinin aynı anda gerçekleştirildiği yeni bir akış enjeksiyon analiz yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmada; karbon nano tüp-gümüş borat (CNT-GB) temelli bir elektrot geliştirilmiş, durgun ve hareketli ortamda tekrarlı çalışması test edilmiştir. Diğer yandan geliştirdiğimiz elektrotun tüm karakterizasyon özellikleri tamamlanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Glikoz, glikolize-albümin ve glikolize-hemoglobinin akış enjeksiyon sistemde mini bir ayırım kolonu ile kısmi ayırımlarının sağlanması ve yeni bir borat seçici sensörün akış enjeksiyon analiz sisteminde dedektör olarak kullanılması ile bu biyoanalitlerin eşzamanlı olarak analizlerinin kısa sürede gerėekleřtirilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda mini ayırım kolonuna yerleştirilmek üzere grafit oksit-aminofenil boronik asit (GO-APBA) bazlı kolon dolgu malzemesi sentezlenmiştir. Böylece santrifüj yapılan kan numunesindeki glikozile hemoglobin, glikozile albümin ve glikoz ayırımı sağlanması hedeflenmiştir.

Geliştirdiğimiz elektrot ile çalışan eşzamanlı analiz yöntemi sayesinde, muayenehaneler, sağlık ocakları, poliklinik ve otoanalizör bulunmayan hastanelerde glikoz, glikolize albümin ve glikolize hemoglobinin eşzamanlı olarak ölçülmesi amaçlanmıştır. Böylece geliştirilen sistemin kısa, orta ve uzun dönem kan şekeri hakkında hızlı bir şekilde bilgi vereceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Biyosensör, diyabetik teşhis, hba1c, fruktozamin, FIA.

Developing a New Measurement Method that Simultaneous Performs Short, Medium and Long-Term Blood Glucose Measurements

Duygu ÜNER BAHAR

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK

Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Diabetes is a metabolic disease and regular glycemic control is necessary to prevent disease progression. Glycemic control is provided by daily fasting glucose measurements or by measurement of glycosylated proteins. However, fasting glucose measurements reflect the current glycemic level and do not give information about the mean glucose level. Glycolysis-hemoglobin (HbA1c) and fructosamine are important parameters that provide information about back-to-blood glucose, exercising or blood glucose levels without being affected by temporary changes in blood glucose.

For the last 30 years, many measurement methods had been developed for HbA1c. These are chromatographic methods based on the difference of charge between HbA0 and HbA1c, chromatographic methods based on the relationship between phenylboronic acid-HbA1c based on structural difference, immunochemical tests based on the antigen-antibody relationship. Methods used in chromatographic methods are expensive, numerous pre-procedures and methods that require

professional users. Non-linear calibration curves and very perishable reagents are problematic in immunochemical tests.

Another important protein used in glycemic control is serum albumin. Serum albumin is used reliably in cases where HbA1c measurements are affected by hemoglobin variants, anemia or renal failure. Since the half-life of human serum albumin (HSA) in the blood is 12 to 21 days, glucose level of the last 2-3 weeks can be measured by glycosylated HSA measurements. This interim measurement can help to prevent the HbA1c to rise. Boranate affinity chromatography, immunoassay techniques and enzymatic methods are the main methods used in glycosylated HSA measurement. Over the last 15 to 20 years, the studies have focused heavily on plasma sugar markers such as glycosylated-albumin and fructosamine that show sugar levels of 2 to 4 weeks.

This study focuses on the development of the flow injection analysis method that simultaneously performs the measurement of glucose, glycosylated-albumin and glycosylated-hemoglobin HbA1c. In the flow injection analysis method, there is a detection chamber containing a borate selective sensor and a mini-column providing limited discrimination. Simultaneous measurement of glucose, glycosylated-albumin and glycated-hemoglobin is achieved by the method developed.

A method or device that measures three parameters together is absent in the literature. Simultaneous measurement method developed with this study; is economical and simple. Therewith, pretreatment requires only centrifugation and lysis of the blood sample.

The aim of the study was to develop a new flow injection analysis method for HbA1c for long-term glycemic control, where glycosylated albumin for medium-term glycemic level and instant sugar measurements for short-term are performed simultaneously. In this study; the silver borate-carbon nano tube based electrode has been developed, and the repetitive operation in a stagnant and mobile environment has been tested. On the other hand, all the characterization features of the electrode we developed are completed and positive results are obtained.

The aim of this study is to provide a partial separation of glucose, glycated-albumin and glycated-hemoglobin in the flow injection system with a minimization

separation column and to get analyzes of bioanalytes in a short time by using a new borate-selective sensor as a detector in the flow injection analysis system. To this end, graphite oxide based column filler material was synthesized to be placed in the mini-separation column. With this, the blood sample of the centrifuged glycosylated hemoglobin, glycosylated-albumin and glucose separation is aimed.

With the simultaneous analysis method that we developed, simultaneous measurements of glucose, glycosylated-albumin and glycated-hemoglobin can be carried out in clinics, health centers, polyclinics and hospitals that do not have autoanalysers. This will be enable to obtain the status of short, medium and long term blood glucose and diabetic condition fast and economically.

Key words: Biosensor, diabetic diagnosis, hba1c, fructosamine, FIA.

1.1 Literatür Özeti

Diyabet, insülinin hiç salgılanmaması ya da hücredeki insulin reseptörlerinin fonksiyonundaki azalma sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Yüksek kan şekeri seviyeleri diyabete bağlı gelişen hastalıkların gelişmesinden birincil etkindir. Şekil 1. 1’de tip1 ve tip 2 diyabet farkı temel düzeyde açıklanmaktadır. Glukoz taşıyıcı tip 4 (GLUT4), insanlarda GLUT4 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Tip1 diyabette pankreas yeterli düzeyde insülin salgılayamamakta ve hücre membranında bulunan insülin reseptörünü aktive edememektedir. Dolayısıyla inaktif olan insülin reseptörü GLUT4 proteini vasıtasıyla glikozun hücre içine alınmasını sağlayamaz. Tip2 diyabette ise pankreas insülini salgılamaktadır ancak insülin reseptörü yeterli düzeyde çalışmamaktadır. Dolayısıyla tip1 diyabetteki gibi glikozun hücre içine alınması yine engellenmiş olmaktadır.

Kan sıvı kısım ve katı kısım olmak üzere iki tip bileşenden oluşur. a. Sıvı kısım; plazma ve serumdan (%55) oluşmakta, b. katı kısım ise kan hücrelerini (%45) içermektedir [1].

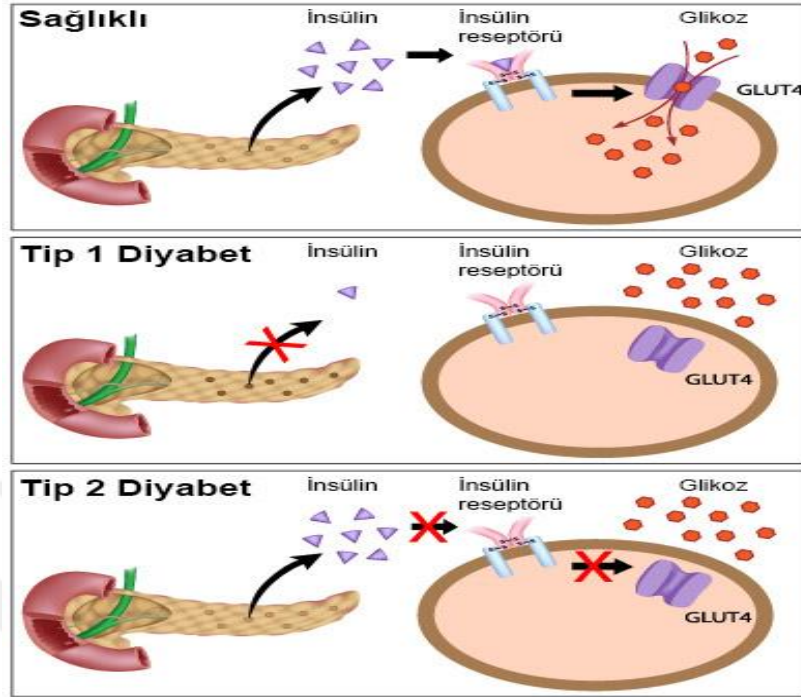
a. Sıvı Kısım:

Serum kan pıhtılaştıktan sonra oluşan sıvı kısmıdır. Serumun plazmadan farkı, serum içerisinde fibrinojen bulunmamasıdır. Serum elde edilmesi için öncelikle kanın pıhtılaşması beklenir ve ardından santrifüj edilerek katı kısım olan hücresel bölümün dibe çökmesi sağlanır.

Plazma; su (% 91), organik maddeler (% 7) (Proteinler) ve inorganik maddeler (%2) den oluşmaktadır.

Plazmada bulunan proteinler ve temel görevleri şu şekildedir: Plazmadaki proteinlerin % 90’ın albumindir ve taşıyıcı görevi yapmaktadır, globulin hem

taşıyıcı, hem de antikor oluşumunda görev yapmaktadır ve fibrinojen ise pıhtılaşmayı sağlamaktadır.



Şekil 1. 2 Diyabet tipleri (tip1 ve tip 2)

b. Katı Kısım:

Kan hücrelerinin % 99'u eritrositlerden oluşmaktadır. Eritrositler hemoglobin taşımaktadırlar. Hemoglobin, hem ve globin olmak üzere, iki kısımdan meydana gelmiştir. Eritrositlere kırmızı rengini veren bir proteindir ve eritrositlerin renkleri içerdikleri hemoglobin miktarına bağlıdır. Hemoglobin oksijeni bağlayarak onun kanda taşınmasını sağlar. Eritrositler kan dolaşımında ortalama 120 gün kalırlar. Zamanla eritrositlerin zarı deforme olur ve dolaşımdaki bazı noktalardan geçerken yırtılırlar. Çoğunluğu dalak olmak üzere, karaciğer ve kemik iliğinden geçerken parçalanırlar.

Tüm kandaki hemoglobin oranı;

- Erkeklerde 16 gram/dl,
- Kadınlarda 14 gram/dl'dir [1].

Glikohemoglobin (HbA1c) hemoglobinin glikozla birleşmesidir. Eritrositlerin 120 günlük ömrü boyunca, hemoglobin kan dolaşımında sürekli glikozla beraber bulunduğundan, hemoglobin üzerindeki bazı aminoasitlere glikoz bağlanır ve glikozillenmiş hemoglobin meydana gelir. Kanımızda bulunan eritrositler hayatta kalabilmek için sadece glikoz kullanırlar. Kırmızı kan hücrelerinin ortalama ne kadar glikoz harcadığı hesaplanır. Bu sayede, diyabet hastasının, hem açlık hem tokluk glikoz değerlerini göstermeye yarayan ortalama bir indeks elde edilir. HbA1c analizi, kan glikozunun uzun süreli (geriye dönük 3 aylık) takibine imkân sağlar. Glikohemoglobin miktarı ne kadar yüksek seyrederse hastanın kan glikoz düzeyi uzun süre yüksek seyretmiş olur.

HbA1c, diyabetlilerde son üç ay içerisindeki ortalama glisemik düzeyleri ile ilgili bilgi veren bir parametredir. HbA1c seviyelerindeki değişiklikler diyabete bağlı gelişen komplikasyonlarda belirleyici olmaktadır. Bunun yanı sıra diyabete bağlı gelişen tüm komplikasyonlar HbA1c seviyelerindeki değişikliklerinden eşit olarak etkilenmezler [2]. Hematolojik ve genetik faktörler de HbA1c seviyesini etkileyebilir [3]. Örneğin anemi, kısa eritrosit yaşam süresi ile ilgili hastalıklar vb. düşük eritrosit üretiminde demir eksikliği, vit12 eksikliği HbA1c seviyesini yükseltirken, kronik ciğer hastalıkları olduğu durumlarda, düşük eritrosit ömrü gibi hastalıklar da HbA1c'yi düşürür. Çünkü glikolizasyonun yarısı 90 günden sonra meydana gelmektedir. Bu nedenle diyabet ilişkili morbidite ve mortaliteyi azaltmak için açlık-tokluk glisemi düzeyi, gün içi glisemik değişkenlik ile HbA1c seviyeleri kabul edilebilir normal aralıklarda tutulmalıdır [2]. Dolayısıyla bu değişkenler birlikte ele alınmalıdır. HbA1c (Dünya Sağlık Örgütü tarafından) diyabet için altın standart kabul edilir. Sağlıklı kişilerde, hemoglobinin % 5-10 kadarı glikozillenmiştir. HbA1c % 6.5' den (veya 48 mmol/mol) büyük değerler diyabet hastası kabul edilir.

HbA1c tayini; hastahanelerdeki laboratuvarlarda elektroforez, kolon kromatografi, sıvı kromatografisi, immünotürbidimetrik metodlarla yapılır [4]. Bu metodlara dayalı ticari kitler bulunmaktadır. Aşağıda bu yöntemler hakkında kısa bilgi verilmiştir [4]:

- 1- İmmünotürbidimetrik tekniği: Antijen-antikor bağlanması ile oluşan immünkompleks süspansiyonunu içeren küvete gönderilen monokromatik

ışığın hem absorbe edilmesi hem de defleksiyona (sapmaya) uğratılması özelliğinden yararlanılan ölçümlerdir. Türbidimetrik yöntemde, immün kompleks tarafından absorbe edilen ışık miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür. Otoanalizör: Numune reaktifleri uygun ölçümlerde alıp karıştıran, belirli süre ve ısıda inkübe eden, gerekli sürelerde optik okumaları yapıp sonunda ilgili analiz sonucunu hesaplanmış olarak kullanıcıya sunan cihazdır.

- 2- Elektroforez tekniği: Elektroforez tekniği uygulamasında yürütme, boyama, temizleme, şeffaflaştırma ve değerlendirme basamakları uygulanır. Yüklü partiküllerin, bir elektrik alanına konulması ve elektrik akımının tesiri ile yüklü partiküllerin birbirinden ayrılması esasına dayanır.
- 3- Sıvı kromatografi tekniği: Sıvı kromatografide sabit ve hareketli fazların her ikisi de sıvıdır. Kromatografi diğer tekniklerle birbirlerinden ayrılmayan aminoasitler, yağ asitleri, steroid hormonlar ve boya maddelerinin ayrılmasında kullanılmaktadır. Rutinde HbA1c, ilaç, hormon, kolesterol gibi maddelerin tayininde kullanılır.

1.2 Tezin Amacı

Çalışmada, uzun dönem glisemik kontrolleri için HbA1c'nin, orta dönem glisemik düzeyi için glikolize-albüminin ve kısa dönem için anlık şeker ölçümlerinin aynı anda gerçekleştirildiği yeni bir akış enjeksiyon analiz yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Geliştirdiğimiz eşzamanlı analiz yöntemi sayesinde, muayenehaneler, sağlık ocakları, poliklinik ve otoanalizör bulunmayan hastanelerde glikoz, glikolize-albümin ve glikolize hemoglobinin eşzamanlı olarak ölçülmesi gerçekleştirilebilecektir. Bu durum ilgili kişinin kısa, orta ve uzun dönem kan şekerinin hızlı ve ekonomik bir şekilde yorumlanmasını sağlayacaktır.

1.3 Hipotez

Borat yapısı gereği glikozile proteinlere bağlanma özelliğine sahiptir. Bu bilgidan yola çıkılarak karbon nano tüp-gümüş borat temelli bir elektrot geliştirilmiştir. Glikoz, glikozile albümin (g-HSA) ve glikozile hemoglobinin (HbA1c) akış enjeksiyon

sistemde mini bir ayırım kolonu ile kısmi ayırımlarının sağlanması ve geliştirilen karbon nano tüp-gümüş borat temelli borat seçici elektrotun akış enjeksiyon analiz sisteminde dedektör olarak kullanılması ile bu biyoanalitlerin eşzamanlı ölçümlerinin borat konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak kısa sürede gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda mini ayırım kolonuna yerleştirilmek üzere GO-APBA (grafit oksit-aminofenilboronik asit) bazlı kolon dolgu malzemesi sentezlenmiştir. Böylece santrifüj yapılan kan numunesindeki HbA1c, g-HSA ve glikoz ayırımı sağlanarak eş zamanlı ölçümlerin sağlanacağı öngörülmüştür.



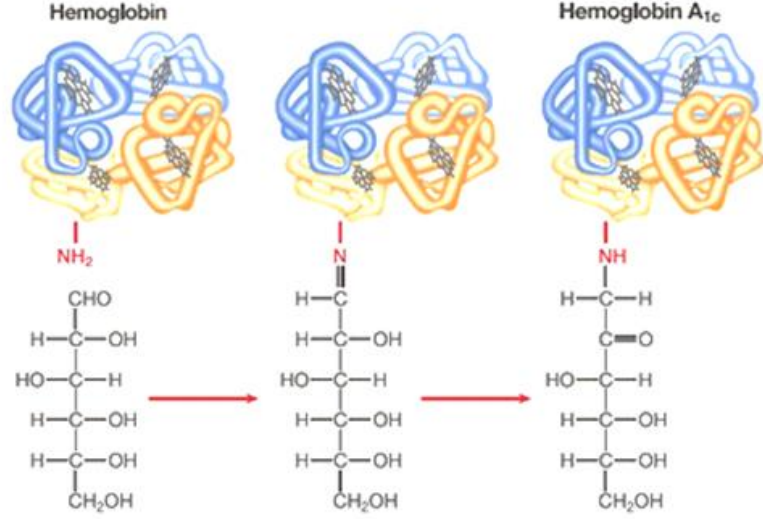
Glikozile Protein Ölçüm Yöntemleri ve Standardizasyonu

2.1 Glikozile Hemoglobin (HbA1c)

HbA1c, (diğer adlarıyla; beta N-(1-deoxyfructos-1-yl) hemoglobin, hemoglobin A1c, glycated hemoglobin, glikohemoglobin, GHb) glikozillenmiş hemoglobini ifade eder. Uluslararası Klinik Biyokimya Derneği (IFCC) tarafından HbA1c, HbA1'in β -zincirinin N-terminal(valinin) amino grubuna glikoz bağlanması ile oluşan dayanıklı yapı [-(1-deoksifruktozil) hemoglobin] olarak tanımlanmıştır. HbA1c kandaki ana glikozile hemoglobindir ve HbA1 'in ~ %80'ni oluşturur [5].

Glikozile proteinler, glikoz ile amino asitler arasında kendiliğinden gelişir ve enzimatik olmayan reaksiyon sonucu posttranslasyonel olarak oluşurlar [5]. Hiperglisemi durumunda birçok protein glikozile olur. Hemoglobin glikozilasyonu 120 gün boyunca zamana bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu ilişki de önceki 120 günün glikoz düzeyi hakkında bilgi verir. HbA1c ölçümünde örnek alımında açlık tokluk fark etmemektedir. Örnek, EDTA'lı tam kandır ve uzun süre bekletilmeden oda ısısında ölçüme alınmalıdır. Kan 4 °C'de 1 hafta, -70 °C'de en az 6 ay saklanabilir. -20 °C'de saklanamaz [6]. Modifiye proteinler diyabet komplikasyonlarına neden olur [3]. Hemoglobinin glikozilasyonu, sıralı iki aşamalı enzimatik olmayan bir reaksiyonla gerçekleşir.

İlk olarak, N-terminal kalıntılarından veya hemoglobin (Hb) içerisindeki Lys kalıntılarının yan zincirinden nötr amino grupları, geri dönüşümlü Schiff baz ara maddeleri oluşturmak üzere şeker moleküllerinde aldehit veya keton gruplarıyla etkileşime girer. Daha sonra, ara ürün daha kararlı bir ketoamin yapısı oluşturmak için geri dönüşümsüz bir moleküller arası Amadori düzenlemesine tabi tutulur [7] , [8]. Normalde bir miktar glikoz hemoglobine bağlı bulunur. Hiperglisemide daha fazla glikozillenme olur. Ölçümden önceki ortalama 3 aylık glisemi ile ilişkilidir. Şekil 2.1'de glikozile hemoglobinin iki aşamalı enzimatik olmayan reaksiyon gösterimi yer almaktadır.

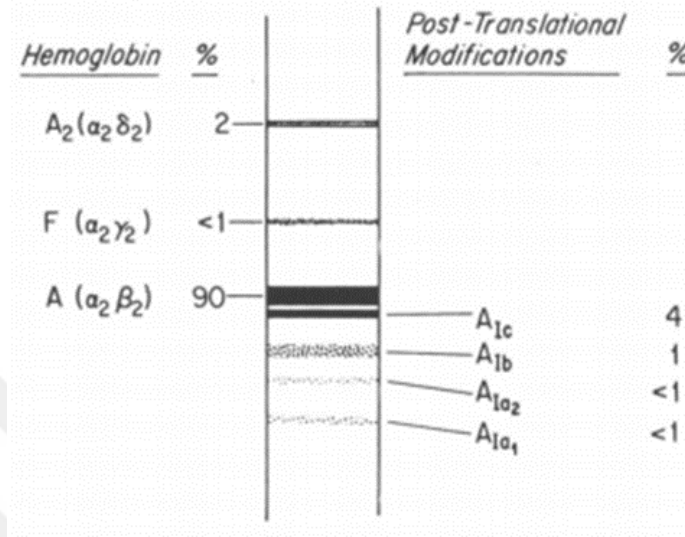


Şekil 2.1 Glikozile hemoglobinin iki aşamalı enzimatik olmayan reaksiyon gösterimi (sırasıyla glikoz, schiff bazı, amadori ürünü)

Normal yetişkin hemoglobini ağırlıklı olarak HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) ve HbF($\alpha_2\gamma_2$) (sırasıyla % 97, 2.5 ve % 0.5) içerir. HbA1c, Hb A'nın posttranslasyonel modifikasyon ürünüdür. Toplam HbA'nın yaklaşık % 6'sı, HbA1a1, HbA1a2, HbA1b ve HbA1c'den oluşan HbA1 olarak adlandırılır. HbA1, HbA0'ın amino asit sekansı ile aynı olmasına rağmen, ana HbA0 bileşeninkinden biraz farklı elektroforetik ve kromatografik özellikleri ile farklılaşmaktadır [9]. HbA1c molekülü üzerinde elektriksel bir yük vardır ve yükün miktarı hemoglobinin farklı bileşenleri üzerindeki yüklerden farklıdır [10]. HbA1c molekülü diğer bileşenlerden farklı büyüklüktedir. HbA1c'nin bu özelliğinden yola çıkılarak çeşitli ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Şekil 2.2'de jel elektrodaklama ile hemoglobin komponentlerinin ayrılması gösterilmiştir.

Enzimatik olmayan glikasyon ile enzimatik glikasyon arasında şöyle bir fark bulunmaktadır: Çoğu protein, (hemoglobin dahil) enzimlerin katılımı olmadan kovalent bileşikler oluşturmak üzere şekerlerle reaksiyona girmektedir. Bu kimyasal işleme enzimatik olmayan glikasyon denir. Elde edilen glikasyon ürünlerinin birikmesi, diyabetin komplikasyonlarının ilerlemesiyle ilişkiliyken, enzimatik glikasyon, enzimatik olmayan glikasyon işlemlerini tersine çevirir ve serbest amino grupları oluşturur [12]. Enzimatik de-glikasyon, memeli hücrelerinde

enzimatik olmayan glikasyona karşı güçlü bir savunma sistemidir. Bu sistem, fruktozamin-3-kinaz (FN3K), glikozillenmiş proteinler üzerinde fosforilasyonlu fruktoselin kalıntısı kullanarak bileşiğin yapısını çözmekte ve glikozillenmiş proteinlerin ayrışmasına neden olmaktadır [13].



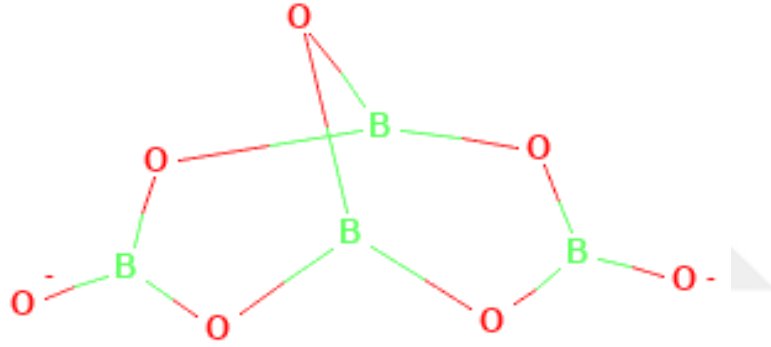
Şekil 2. 2 Jel elektroodaklama ile kan hücresi hemoglobin komponentlerinin ayrılması [11]

Diyabetli bireylerde enzimatik olmayan glikasyon engellenemediği için aşırı hiperglisemi atakları görülür [14]. Bu durum uzun vadede, protein yapısının stabilitesini değiştirmekte ve sonuçta hücresel işlev bozukluğuna yol açmaktadır [15]. Bu nedenle diyabet düzenli glisemik kontrol takibi gerektiren bir hastalıktır.

HbA1c, kan şekeri konsantrasyonlarındaki kısa süreli dalgalanmalardan etkilenmediğinden, örneğin yiyeceğin ne zaman alındığına bakılmaksızın HbA1c testi için kan alınabilmektedir. Klinik laboratuvarlarda halen kullanılmakta olan 3 ana HbA1c test yöntemi vardır [3]. Bunlar; kromatografi esaslı test (HPLC tahlili), antikör bazlı immünolojik test ve enzim bazlı test. Bunların dışında son yıllarda kullanım kolaylıkları, yüksek hassasiyetleri, yüksek ölçüm hızları ve düşük maliyetleri nedeniyle elektrokimyasal yöntemler (biyosensörler) üzerinde çalışmalar yoğunlaşmaktadır.

2.2 HbA1c ve Borat İlgisi

Bor, periyodik tabloda “B” simgesiyle gösterilen, atom numarası 5, atom kütlesi 10,8 g, moleküler ağırlığı 155.233 g/mol, yoğunluğu 2,84 g/cm³, erime noktası 2200 °C ve kaynama noktası 3660 °C olan, metal ile ametal arası yarı iletken özelliklere sahip bir elementtir. Doğal olarak borun iki tane izotopu vardır. Bunlar; ¹⁰B (% 18,8) ve ¹¹B (% 81,2) izotoplarıdır. Her ikisinin çekirdeği de spine sahip olduğu için nükleer manyetik rezonans araştırmalarında kullanılır. Bor elementinin oksijene karşı aktivitesi oldukça yüksektir ve uygun şartlarda bor oksitleri meydana getirmektedir. Bor oksitler, alkali ve toprak alkali metalleriyle kolaylıkla birleşerek bor bileşiklerini meydana getirirler [16], [17]. Şekil 2.3’de borat ($B_4O_7^{2-}$) 2D moleküler görünümü yer almaktadır.

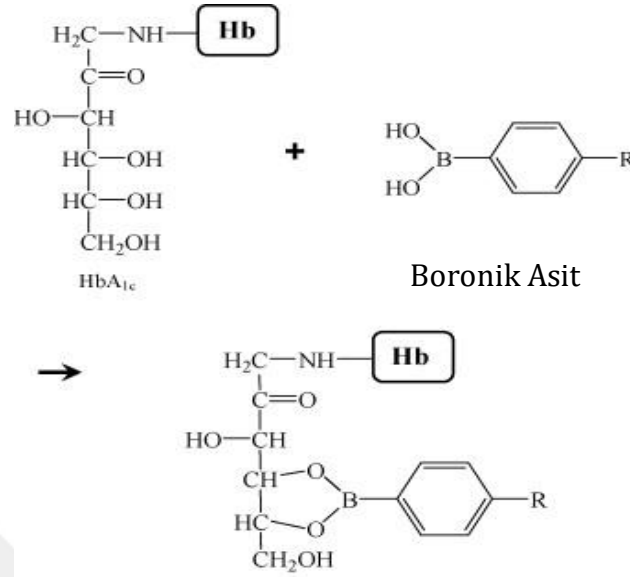


Şekil 2. 3 Borat ($B_4O_7^{2-}$) 2D moleküler görünümü [18]

Boronik asit türevleri, glikozile edilmiş proteinlerdeki şeker kısmının cis-diol grubu için yüksek bir afiniteye sahiptir [8]. Glikoproteinler, moleküler tanıma, hücre içi sinyal iletimi, bağışıklık yanıtı gibi birçok biyolojik süreçte kilit rol oynamaktadır. Bu nedenle, gliko proteinlerin konsantrasyon seviyelerinin analizi önem taşımaktadır [19], [20].

Boronik asitler, alkali bir sulu çözelti içinde beş veya altı üyeli siklik esterler oluşturmak için cis-diollerle kovalent reaksiyona girmektedirler. Ayrıca ortam asidik pH'ya değiştirildiğinde siklik esterler ayrılmaktadır. Bu özellik birçok

algılama ve ayırma uygulaması için boronik asitler cazip ligandlar yapmaktadır [21]. Şekil 2.4’de boronik asit ile HbA1c bağlanması gösterilmektedir.

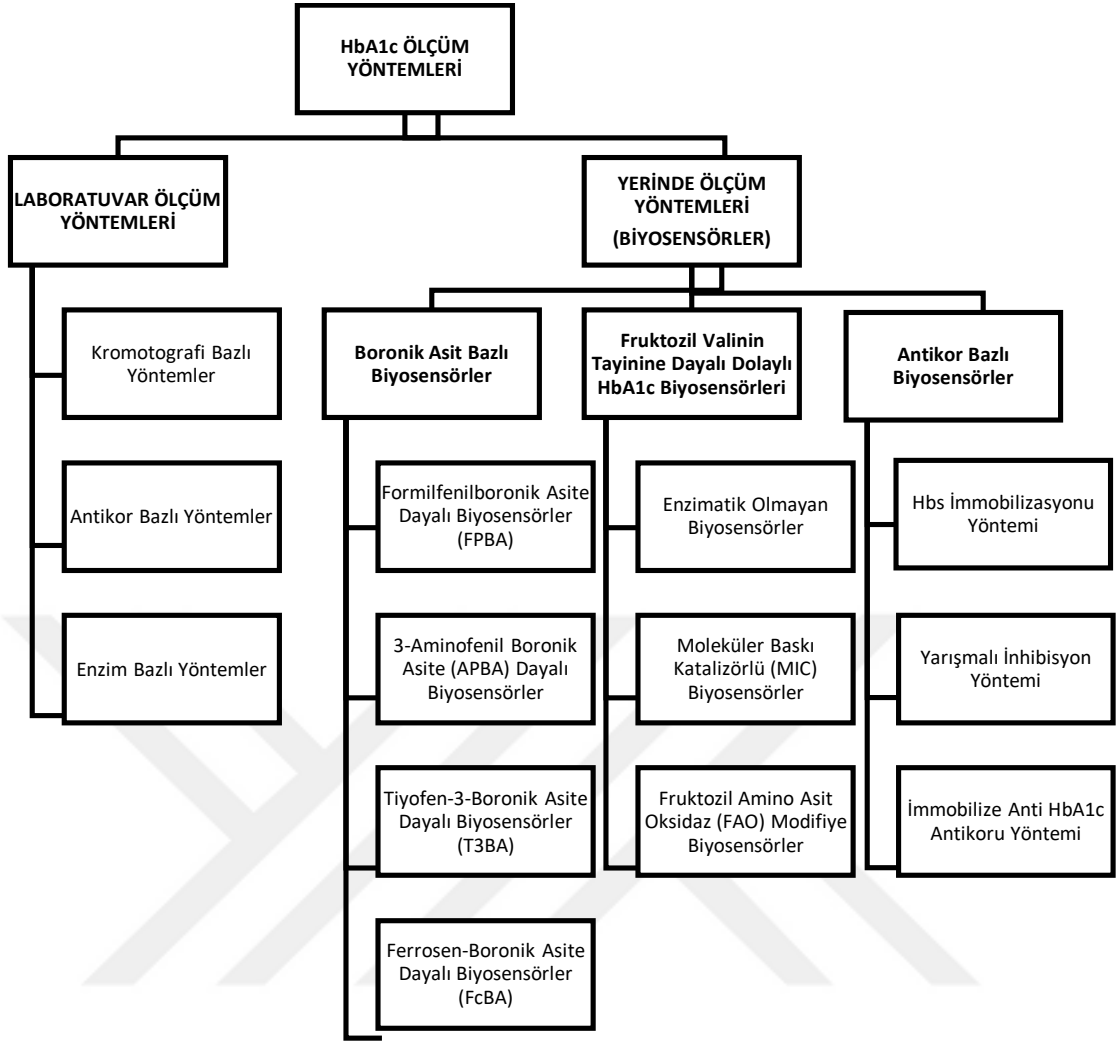


Şekil 2. 4 Borat ve HbA1c bağlanması [22]

2.3 HbA1c Ölçüm Yöntemleri

Hemoglobin A1c (HbA1c), diabetes mellitusun uzun süreli kontrolü için en önemli izleme parametrelerinden biridir. Glikohemoglobinin (GHb) ölçümü için çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir. Şekil 2.5’de literatürdeki HbA1c ölçüm yöntemleri; laboratuvar da ölçüm ve yerinde ölçüm yöntemleri olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmıştır.

Klinik kullanım potansiyeline sahip iyi bir sensör sistemi, bir yandan fonksiyonellik ve reaktif depolama stabilitesi sağlarken diğer yandan HbA1c seviyesini hassas ve tekrarlanabilir şekilde değerlendirebilmelidir. Sensör sistemi, HbA1c’yi glikozile olmamış hemoglobinden (HbA0) veya diğer girişimlerden ayırt edebilmeli ve standart bir analitik metotla mükemmel bir uyum sergilemelidir. Diğer yandan düşük maliyetli malzeme ve üretim tekniği seçimi biyosensör üretiminde ulaşılabilirlik açısından önem taşımaktadır. Biyosensör sistemlerinde altın, yaygın olarak kullanılmış olsa da, biyouyumluluk ve uygun maliyet özellikleri nedeniyle çoğunlukla karbon veya membran bazlı malzemeler tercih edilmektedir.



Şekil 2. 5 HbA1c ölçüm yöntemleri sınıflandırması

Genel olarak, HbA1c biyosensör sistemlerinde plazma girişimlerini gidermek ve eritrositlerin parçalanması için bir ön işleme ihtiyaç duyulmaktadır. Hb ve HbA1c bu biyosensör sistemleri kullanılarak ayrı ayrı ölçülebilmektedir. HbA1c tahlili için biyosensörlere hemolizat numunesi uygulanmadan önce Hb konsantrasyonunu ölçmek için bir UV-Vis spektroskopisi yöntemi kullanılabilir. HbA1c içeriği bu verilerden kolayca hesaplanabilir. Bununla birlikte, bu tür bir algılama yöntemi pratikte elverişli değildir, çünkü algılama ve ayırma farklı işlemlerdir.

Geçtiğimiz on yılda laboratuvarda HbA1c ölçümünde immunoassay [23], iyon değişimi kromatografisi [24], boronat afinite kromatografisi [25], elektroforez [26], [27] ve kolorimetrik yöntemler [28] gibi çeşitli HbA1c tespit yöntemleri

geliştirilmiştir. Bu yöntemler yük farklılıkları, yapısal farklılıklar ve kimyasal reaktivite temelinde üç temel kimyasal ilkeye dayanmaktadır. Bu yöntemlerin çoğu, çeşitli Hb formları (HbC, HbS, HbE, HbD ve HbF) ve / veya Hb'nin modifikasyonunu (cabamillenmiş Hb, asetillenmiş Hb, değişken HbA1c) içeren Hb varyantlarından en az bir veya daha fazla girişime maruz kalmaktadır [29], [8].

Biyosensörlerle HbA1c tayininde kişinin evde kullanabileceği pratik bir kullanım amaçlanmaktadır. Bu nedenle son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Biyosensörleri boronik asit türevlerine dayalı afinite biyosensörler, fruktozil valin ile dolaylı yoldan HbA1c ölçen biyosensörler ve antikor bazlı biyosensörler olarak sınıflandırmak mümkündür.

2.3.1 Yerinde Ölçüm Yöntemleri (Biyosensörler)

Bu bölümde HbA1c ölçümü için tam kan numune analizindeki biyosensör uygulamaları ve diyabet için non-invaziv biyosensörler özetlenmiştir. En çok kullanılan boronik asit bazlı elektrokimyasal biyosensörler; kullanılan boronik asit türevinin tipine, elektrot yüzey modifikasyonuna ve tespit yöntemine göre özetlenmektedir.

A. Boronik Asit Türevlerine Dayalı Afinite Biyosensörleri

Boronik asit türevleri, glikozile edilmiş proteinlerdeki şeker kısmının cis-diol grubu için yüksek bir afiniteye sahiptir; bu durum HbA1c dahil glikozile edilmiş proteinlerin saptanması için çeşitli afinite bazlı ölçüm yöntemlerinin temel prensibidir [8]. Bor bazlı yöntemin temel avantajlarından biri ölçümün HbF, HbS, HbC gibi hemoglobin varyantlarını etkilememesidir ki bu da boratı HbA1c ölçüm metotları için uygulanabilir kılmaktadır. Diğer yandan boronat bazlı reaktifler, HbA1c antikorlarına kıyasla daha stabil ve düşük maliyetlidir. Bor- cis-diol kovalent bağı, doğası gereği GHb'yi ölçmekte ve numunedeki diğer endojen şeker molekülleri ile de etkileşime girmektedir.

Diğer yandan bor bazlı biyosensörlerde glikozillenmiş Hb ve glikoz molekülleri arasında bir seçicilik olmadığı için, katalizör olarak hem demirin kullanılmasıyla veya plazmadaki diğer bileşenleri giderilmesiyle bu sorun çözülebilmektedir.

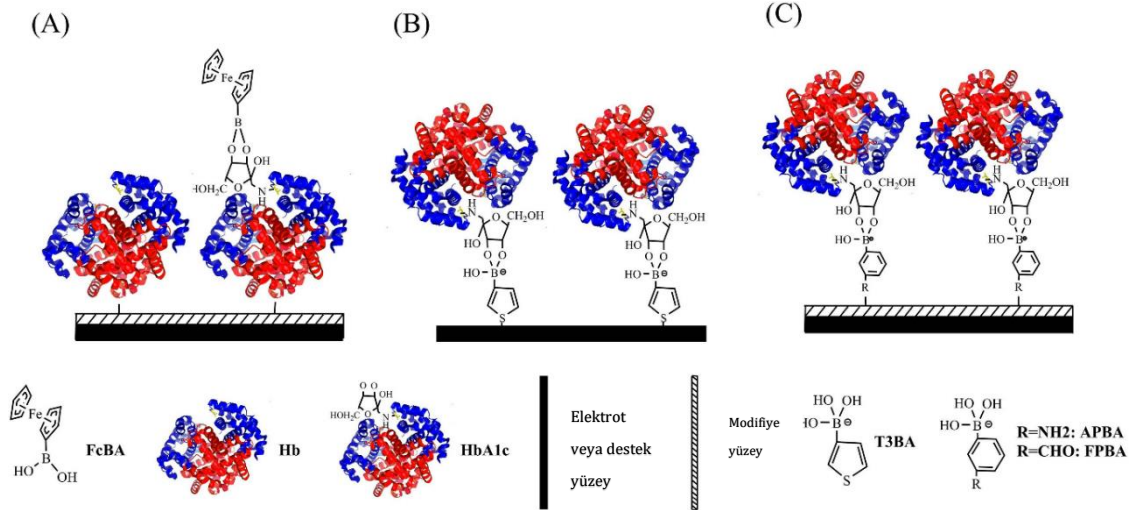
Borat bazlı affinite böyosensörleri hazırlamada birkaç yöntem vardır. Birinci yöntem, Hbs'i (hem HbA hem HbA1c) önce bir elektrot yüzeyinde haptogloblin (Hp) ile bağlamak ve sonra sisteme ferrosen-boronik asit (FcBA) eklenmesidir. Elektrokimyasal sinyallerle incelenebilen FcBA, Hb ile değil, sadece HbA1c ile etkileşime girer. İkinci yöntem ise boronik asit türevlerinin elektrot üzerinde immobilize edilmesidir; bu, uygun bir elektrik sinyalinin algılanabileceği HbA1c'nin seçici bir şekilde bağlanmasına yol açar. FcBA, HbA1c'nin belirlenmesinde çift rol oynar. İlk olarak, molekülün boronik asit kısmı HbA1c ile etkileşime girer. İkincisi, ferrosen kısmı redoks aktif bir etikettir, bu nedenle hem hedef tanıma hem de sinyal üretimi için kullanılabilir.

Son yıllarda, 3-aminofenilboronik asit (APBA), tiofen-3-boronik asit (T3BA) ve formilfenilboronik asit (FPBA) dahil olmak üzere HbA1c'nin yakalanması ve saptanması için boronik asit bazlı biyosensörler geliştirilmiştir.

Ferrosen-Boronik Asite Dayalı Biyosensörler (FcBA):

Boronik asitleri elektrot yüzeyine tutturmak için, çapraz bağlayıcılar kullanılmalıdır. Örneğin, elektrotlar, boronat afinite tabakasını (Şekil 2.7C) oluşturmak için öncelikle sisteamin ile kendinden montajlı tek tabaka (SAM) ile ardından glutaraldehit ve son olarak da APBA [30] ile modifiye edilebilir. Şekil 2.6'da boronik asit bazlı HbA1c sensöründe (A)FcBA, (B)T3BA, (C) APBA/FTBA kullanılarak HbA1c tanınması gösterilmektedir.

Halámek ve ekibi HbA1c'nin tespiti için FcBA bazlı biyosensörler geliştirmişlerdir [31]. Hbs, yüzey aktif madde ile modifiye edilmiş yüzeye emdirilir ve ardından kütle duyarlı kuvars kristal dengesi ve voltammetri kullanılarak toplam Hb ve HbA1c izlenir. APBA modifiye edilmiş elektrotlara bağlanan HbA1c geri dönüşümlüdür, böylece yeniden kullanılabilir bir ölçüm sistemi tasarlanabilmektedir. Böylece akış enjeksiyonuna dayalı yeni bir HbA1c biyosensörü geliştirilmiştir [32]. Bu çalışmada HbA1c konsantrasyonunu ayırmak için 3-APBA ile değiştirilmiş bir vitröz karbon elektrot kullanılmıştır, bunu takiben kitosan içeren bir sol-jel ile değiştirilmiş elektrot kullanılarak hemoglobin tespiti ve karbon nanotüp içine tutturulmuş bir tetraentil silika ilave edilmiştir. Bu sensör, sinyal ve Hbs konsantrasyonları arasında iyi bir ilişki göstermiştir.



Şekil 2. 6 Boronik asit bazlı HbA1c sensör yapımında (A)FcBA, (B)T3BA, (C) APBA/FTBA kullanılarak HbA1c tanınması [8]

Tiyofen-3-Boronik Asite Dayalı Biyosensörler (T3BA):

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), iletkenlik veya dielektrik sabiti değişimlerini ölçerek elektrot yüzeyindeki sıralı kimyasal modifikasyonları karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Cihaz, membran boyunca küçük bir salınım voltajını bir dizi frekansın üzerine yerleştirir. Ortaya çıkan akım ve faz kayması, arayüz hakkında bilgi sağlayan verilerdir. T3BA ile modifiye edilmiş biyosensörler üzerindeki HbA1c konsantrasyonu, heksasiyanoferrat (HCF) ile immobilize edilmiş HbA1c tarafından oluşan yük transfer direnci değişikliklerinin izlenmesiyle ölçülür [33], [34]. Bazı sensörler, yüzeye bağlı HbA1c'yi redoks göstergesine ihtiyaç duymadan elektrot ara yüzünün kapasitif davranışlarını kullanmak için geliştirilmiştir [35].

3-Aminofenil Boronik Asite (APBA) Dayalı Biyosensörler:

Yapılan bir çalışmada 3-aminofenil boronik asit-grafen oksit (APBA-GO) konjugatının amid bağı ile sentezi yapılarak glikozile hemoglobin belirlenmiştir [36]. GO'nun yüksek düzeyde iletken olması ve geniş yüzey alanına sahip bir materyal olması, APBA-GO modifiyeli biyosensörlerin performansını olumlu yönde etkilemiştir.

Doğal gözenekli bir lif olan yumurta kabuğu zarları da düşük maliyetli bir protein immobilizasyonunda platform olarak kullanılabilir. 3-APBA ile modifiye edilmiş bir biyosensörü kullanılarak HbA1c % 0.19'luk tespit limitiyle (% 2.3 ~ 14) klinik olarak ölçülebilir [37].

Başka bir çalışmada bir politeriyofenebenzoik asit (pTTBA) ile modifiye edilmiş plakaya basılmış elektrotlara kimyasal olarak bağlanmış APBA kullanılarak tek kullanımlık bir biyosensör üretilmiştir [38]. HbA1c, katalitik indirgeme H_2O_2 'nin tepki yanıtı ile ara yüz üzerindeki protein hemi ölçülerek elde edilir. Bu sensör, filtrelemeyle hazırlanan basit parmak delerek elde edilen kan örneklerinin analizi için başarıyla kullanılmıştır, amperometrik olarak HbA1c seviyelerine % 0.1 ~ 1.5 oranında doğrusal bir tepki gösterir.

Yukarıdaki çalışmalar HbA1c'nin doğrudan elektrokimyasal tespitini sağlayabilmesine rağmen, HbA1c'nin göreceli elektrokimyasal hareketsizliği nedeniyle redoks mediatörü veya H_2O_2 gibi bir ekzojen redoks göstergesinin eklenmesini gerektirmektedir.

Formilfenilboronik Asite Dayalı Biyosensörler (FPBA):

FPBA ile yapılan bir çalışmada, FPBA ile modifiye edilmiş bir arayüz üzerine HbA1c'nin immobilize edilmesiyle oluşturulan bir yüzeye, bilinen miktarda glikoz oksidaz (GOx) doldurularak enzimatik bir yarışmalı bağlanma tahlili geliştirilmiştir. HbA1c ve GOx arasındaki ters konsantrasyon korelasyonu nedeniyle, GOx'in elektrokimyasal sinyali, HbA1c arttıkça azalmaktadır [39], [40].

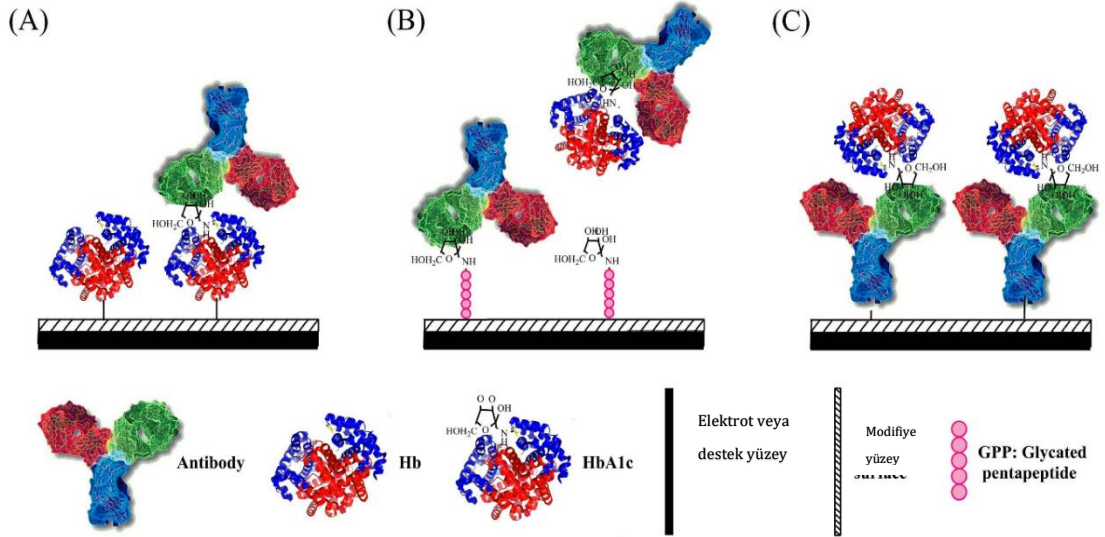
2012 yılında yapılan bir çalışmada sistamin-FPBA konjugatı, HbA1c ve GOx'u cis-diol etkileşimi yapılarak bir altın elektrot yüzeyini işlevselleştirmek için kullanılmıştır. Bu yöntem, tam kan numunelerinde HbA1c tespiti için uygulanmaktadır. Sistamin-FPBA/Au elektrotundaki HbA1c-GOx yarışmalı bağlanma tahlili, HbA1c seviyesini % 4.5 ila % 15 aralığında ölçebilmektedir.

B. Antikor Bazlı Biyosensörler

Genel olarak antikor bazlı immünobiyosensörler, bileşenlerin HbA1c veya HbA1c'ye özgü antikorun immobilizasyonuna odaklanarak HbA1c'nin saptanmasını amaçlar. Yüksek spesifikliği ve seçiciliği nedeniyle HbA1c antikoru, HbA1c'yi ölçmek için en

iyi yöntemlerden biridir. Örneğin latex bağlı immunoassay metotta HbA1c antijen molekülü ile spesifik lateks kürecikleri ile kaplı HbA1c antikoru arası etkileşim ölçülmektedir. Örnekteki antijen miktarından okuma sağlanır [3]. Diğer yandan farklı bir yöntem olan doğrudan enzimatik HbA1c ölçüm metodunda ise horseradish peroxidase katalizör olarak kullanılır. Tek kanallı test ile doğrudan % HbA1c ölçümü sağlanmaktadır. Bu yöntem ile çok sayıda ölçüm yapabilmek mümkündür. HPLC ve immunoassay ile mükemmel korelasyon sağlamaktadır. Hemoglobin varyantları ile etkileşimi olmamaktadır, tek kanallı ölçüm olduğundan daha hızlı, basit ve etkin ölçüm sağlamaktadır. Toplam hemoglobin ölçümüne de gerek yoktur [3].

Farklı immobilizasyon bileşenlerine dayanan immüno-biyosensörler üç kategoriye ayrılabilir. Birinci tip, Şekil 2.7 A'da görüldüğü gibi Hb ve HbA1c'nin bir elektrotun yüzeyi üzerinde farklılaşmadan hareketsiz hale getirildiği Fc-modifiye edilmiş elektrot ile benzerdir. İkinci tip, Şekil 2.7 B'de görüldüğü gibi HbA1c analogunu, HbA1c'ye özgü antikor bölgeleri için HbA1c ile rekabet eden elektrot yüzeyine bağlamaktır. Üçüncü tip, Şekil 2.7 C'de görüldüğü gibi sadece HbA1c için tanıma ve yakalama elemanı olarak kullanılan sabit bir antikordur.



Şekil 2. 7 HbA1c immüno-sensörü yapımında (A) deoxycholic acid (DOCA) veya Hp, (B)Glikozile pentapeptid (GPP), (C) 3-MPA, PPy-Au Np ve SAM karışımı kullanılarak HbA1c tanınması [8]

Hbs immobilizasyonu: Bu tip antikor bazlı biyosensörde elektrot yüzeyinde Hbs immobilizasyonu söz konusudur. Hbs immobilizasyonu için deoxycholic acid (DOCA) ile modifiye edilmiş ara yüzeye [31], anti-HbA1c immünoglobulin G (IgG) kullanılarak HbA1c'ye seçici bir şekilde bağlanmıştır ve IgG üzerindeki çoklu şeker kısımlarına bağlanan FcBA elektrokimyasal sinyali çoğaltmak için kullanılmıştır (Şekil 2.8A) [41] FcBA'nın kare dalga voltammogramlarının anodik tepe yüksekliği, yüzeyde bulunan HbA1c ile ilişkili IgG-FcBA ile orantılıdır. Bu elektrokimyasal immünosensörün duyarlılığı, FcBA-bazlı HbA1c sensörlerinden üç kat daha fazladır. Bir çalışmada Hbs zenginleştirmesi için, Hp-modifiye edilmiş selüloz zarının birinci tabakasından oluşan bir sandviç tipi HbA1c sensör geliştirilmiş ve buna anti-HbA1c antikorunu ilave edilmiştir [42]. Hem HbA1c-sandviç ELISA deneyi tarafından üretilen optik sinyal, hem de Hp / anti-HbA1c-GOx / Clark-tipi elektrottan üretilen elektrokimyasal sinyaller, klinik olarak % 5 ila % 20 HbA1c aralığında doğrusal bir korelasyon sağlamaktadır. Ancak HbA1c-sandviç immünolojik testinin mevcut durumu, membran başına tek kullanım olması, uzun saptama süresi ve büyük bir su seyreletme işlemi gerektirmesi nedeniyle tercih edilmemektedir.

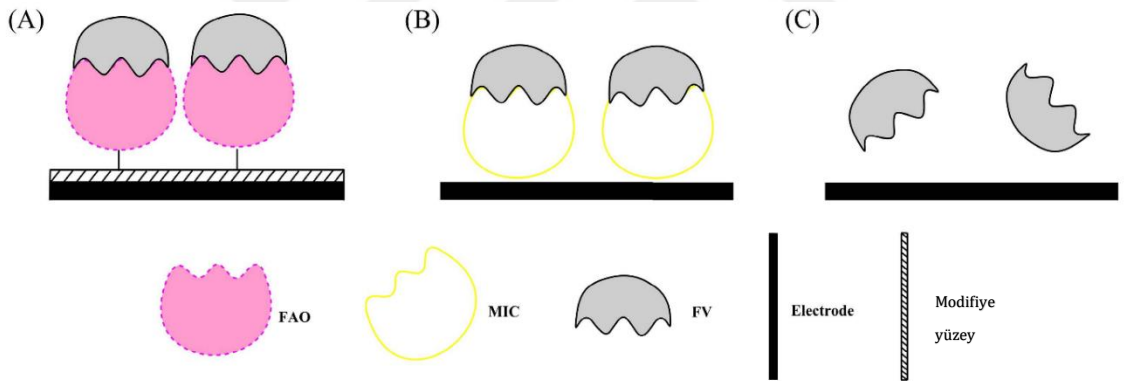
Yarışmalı inhibisyon: Yarışmacı inhibisyon yönteminde glikozile pentapeptid HbA1c analogu olarak immobilize edilir. Boronik afinitedeki yarışmalı inhibisyon yöntemine benzer şekilde, HbA1c analitinin ve yüzeye bağlı glikozile pentapeptid (GPP) epitopunun bilinen miktardaki anti-glisine bağlanması esasına dayanarak HbA1c tespiti için bir immünoenzimometrik analiz geliştirilmiştir [43]. Absorbans spektroskopisi ile ölçülen glikoz oksidaz antikorunun enzimatik aktivitesi, yüzeye bağlı anti-HbA1c antikorunun miktarıyla orantılıdır, ancak HbA1c konsantrasyonu ters orantılıdır. Protein modifiyeli selüloz membranının bir kez kullanılmasıyla karşılaştırıldığında, GPP-modifiye yüzey çok iyi bir tekrarlanabilirlik sergiler ve bağlayıcılık kaybı olmadan 20 defadan fazla tekrarlanabilir.

İmmobilize anti-HbA1c antikor: Bu tip antikor bazlı biyosensörde sadece HbA1c için tanıma ve yakalama elemanı olarak kullanılan sabit bir antikor vardır ve HbA1c antikorunun immobilizasyonu ile ilişkilidir. Anti-HbA1c antikorunun elektrot yüzeyinde immobilizasyonu, HbA1c'yi bağlamak için en doğrudan ve spesifik

yoldur. SAM-3-Merkaptopropiyonik asit (MPA) ile muamele edilmiş altınla çalışan bir elektrotun yüzeyine HbA1c-spesifik antikorun kovalent olarak immobilize edilmesiyle, HbA1c'nin bağlanması redoks mediatörü olarak ferrikiyanit / ferrosiyanid kullanılarak izlenir [44]. Bu tip biyosensörler diyabetik tedavi için HbA1c'nin in vitro ölçümünde uygulama için büyük bir potansiyele sahiptir.

C. Fruktozil Valinin Tayinine Dayalı Dolaylı HbA1c Biyosensörleri

HbA1c, fruktozil amino asit oksidaz (FAO) ile enzimatik reaksiyona girer ve fruktozil valin (FV) kısmı parçalanarak kantitatif olarak ölçülebilen bir potansiyel oluşturur. Şekil 2.9'da FV tabanlı biyosensör kategorisi vardır. Birinci tür dolaylı HbA1c sensörleri, enzimatik reaksiyondan önce elektrot yüzeyinde immobilize edilmiş olan FAO tarafından FV'nin elektro oksidasyonunu ölçer (Şekil 2.8 A). İkinci tür, FV'yi oksitlemek için yapay enzim olarak moleküler baskılı bir polimerin (MIP) yapımını içerir (Şekil 2.8 B). Üçüncü tip ise elektrokimyasal sensörler kullanarak FV oksidasyonunu doğrudan ölçmektedir (Şekil 2.8 C).



Şekil 2. 8 Dolaylı HbA1c biyosensörü yapımında (A)PVA-SbQ veya NP tutturulmuş elektrot yüzeyi, (B)MIC metodu, (C) enzimatik olmayan metod kullanılarak fruktozil valin tanınması [8].

Fruktozil Amino Asit Oksidaz (FAO) Modifiye Biyosensörler:

FAO bazlı biyosensörler için enzim ya fotobazik olarak stilbazol (PVA-SbQ) ile çapraz bağlanmış poli (vinil alkol) ile yapılmış filmde tutulabilir [45] ya da iridyum nanotabakalar (Ir) NP'ler [46], Fe₃O₄ NP'ler [47], ZnO NP'ler [48] ve Au NP'ler [49] gibi nanopartiküler malzemelerin yüzeyinde hareketsiz hale getirilebilir. NP'ler, PPy

ve grafen nanotabakalar FAO ile modifiye edilmiş biyosensörlerin üretimi için kullanılabilir. Ancak FAO enzimi hala çok pahalıdır ve FV'nin elde edilmesi, HbA1c testlerinin maliyetini arttırmaktadır.

Moleküler Baskı Katalizörü (MIC) Modifiye Edilmiş Biyosensörler:

Sode ve ekibi tarafından yapay bir enzim oluşturmak için moleküler baskı teknolojisi ile MIC tabanlı bir sensör geliştirilmiştir [50]. MIC, FV'ye düşük bir seçiciliğe sahiptir, bu yüzden seçiciliğini arttırmak gerekmektedir. Bu amaçla bir çalışmada alillamin de kullanılmıştır [51] ancak seçiciliği pratik kullanım için istenilen düzeyde yüksek çıkmamıştır.

Enzimatik Olmayan Biyosensörler:

FV konsantrasyonu, enzimatik olmayan bir sistemde de ölçülebilir. Bir çalışmada hem FV molekül tanıma hem de elektrokimyasal sinyal iletimi için FcBA modifiye elektrot geliştirilmiştir [52]. Amperometrik sinyal, mM seviyesinde FV konsantrasyonu tespiti için yeterli düzeyde doğrusal çıkmıştır. Ancak askorbik asit gibi engelleyici bileşikler bu potansiyelde oksitlenebilir ve yanlış okumalar verebilir.

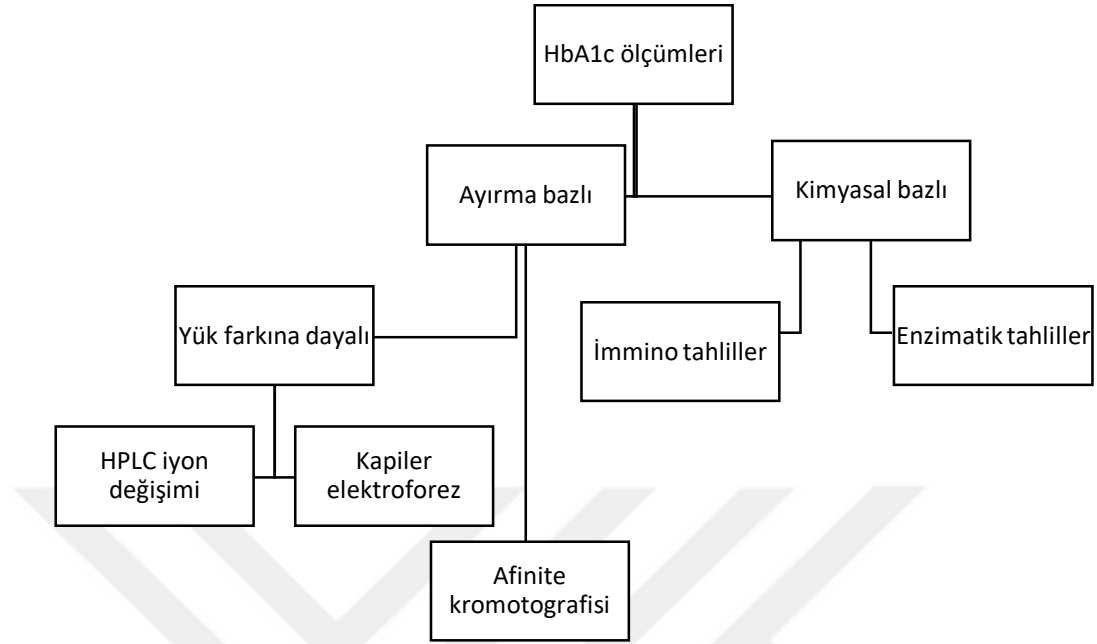
2.3.2 Laboratuvar Ölçüm Yöntemleri

HbA1c'lerin belirlenmesi için uygulanmakta olan 30'dan fazla farklı laboratuvar yöntemi vardır. Bu yöntemler yük farklılıklarına (iyon değişim kromatografisi, HPLC, elektroforez), yapısal farklılıklara (afinite kromatografisi ve immünoassay) veya kimyasal analizlere (fotometri ve spektrofotometri) dayalı teknik kullanarak hemoglobini GHb'den ayırır [53]. Sonuç, toplam Hb'nin yüzdesi olarak ifade edilir. Şekil 2.9'da bu teknikler sınıflandırılmıştır.

HbA1c nin yük miktarı ve molekül büyüklüğü diğer hemoglobin bileşenlerinden farklıdır. Kromatografik yöntemler HbA1c'nin bu özelliğini baz alarak ölçüm sağlamaktadır. HbA1c kısa dönem kan glikoz konsantrasyonundaki değişikliğinden etkilenmediğinden kromatografik yöntemler ile ölçüme uygundur.

İyon değişim kromatografisi: Hb varyantlarını yük temelinde ayırır. Tek kullanımlık mini kolon içinde paketlenen katyon değişim reçinesi (negatif yüklü), pozitif yüklü olan Hb'ye yakın bir afiniteye sahiptir. Hastanın numunesi hemolizlidir ve hemolizatin bir kısmı kolona uygulanır. Bir tampon uygulanır ve elüent toplanır.

Burada GHb diğerlerinden daha az pozitif yüklenmiştir, bu yüzden ilk önce diğerlerinden ayrılmaktadır.



Şekil 2. 9 HbA1c ölçüm yöntemlerinin analitik kavramları ve bunların Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu- referans ölçüm prosedürü (IFCC-RMP) ile izlenebilirliği.

Ardından elüe edilen GHb (A1a, 1b ve 1c, topluca A1) spektrofotometrede ölçülür. Diğer Hbs elüsyondan sonra ölçülür ve HbA1 toplamın yüzdesi olarak ifade edilir.

Yüksek basınçlı (veya performans) sıvı kromatografi (HPLC): HPLC, HbA1c ve diğer fraksiyonların ayrılması ve miktar tayini için kullanılmaktadır. Farklı yük ve büyüklükteki molekülleri ayırarak ölçüm sağlamaktadır. HPLC, katyon değişim kromatografisini kullanarak tayin yapmaktadır. HPLC, karışımları farklı bileşen moleküllerine ayıran bir malzeme ile doldurulmuş kolon boyunca basınç altında geçirerek numuneyi (örneğin kanı) çeşitli bileşenlerine ayırmaktadır. HbA1c içeriği, HbA1c pik alanının toplam hemoglobin pik alanına oranından ölçülür [53], [54], [55]. Ancak bu yöntem kırmızı kan hücresini hemolize daha yatkın hale getirerek, glikozilasyonun oluşma süresini azaltır ve yanlış (beklenen değerden daha düşük) bir A1C sonucu üretebilir [55].

Boronat afinite kromatografisi: Afinite jel kolonları, kolona bağlanan GHb'yi, fraksiyondan ayırmak için kullanılır. M-Aminofenilboronik asit, boncuklu agaroz veya başka bir matrise (örneğin cam lifi) çapraz bağlanma ile immobilize edilir. Boronik asit, Hb de glikoz bağının cis-diol grupları ile etkileşime girer ve böylece GHb'yi kolon üzerinde seçici bir şekilde tutan tersinir beş üyeli bir halka kompleksi oluşturur. Boronik asit Hb'yi bağlamaz. GHb'yi elute etmek için sorbitol eklenir. GHb yüzdesini hesaplamak için 415 nm'de ölçülen bağlı ve bağlı olmayan fraksiyonların absorbanı ölçülür. Susuzlaştırılmış Hb bağlanmaz ve yıkama ile çıkarılır. Sorbitol, boronat bağlanma bölgeleri için yarışır [53], [3]. Glikozile olan ve olmayan ayrımı bu seçilme ile sağlanmış olur. Bu yöntemde sadece iki fraksiyon bulunduğundan (glikozillenmiş ve glikozillenmemiş), glikozillenmiş kısım toplamla karşılaştırılır ve sonuçlar % HbA1c olarak ifade edilir. HbA1c tespiti için doğrusallık aralığı % 5,3 ila % 17'dir [3].

Kapiller elektroforez: Kaplier elektroforezde HbA1c'nin yük / kütle oranına göre ayrılması için iki olasılık mevcuttur. Birincisi hemoglobinin izoelektrik noktası altındaki pH'nın asidik tamponundaki katyonları analiz edilir. Hemoglobin A1C ve A0'ın ayrılması, HbA1c molekülündeki pozitif yüklü bir amino grubuna glikoz parçası eklenmesi ile oluşan bir yük farkı ile elimine edilmesinden sağlanır. İkinci yöntemde ise elektroanalitten borat anyonu ile HbA1c'ye seçicilik sağlanır ve alkali koşullardaki anyonlar ölçülerek HbA1c analiz edilir [3].

Agar jel elektroforezi: pH 6.3'teki tam kan hemolizatlarındaki agar jel elektroforezi, HbA ve HbA1'in iyi çözünmesini sağlamaktadır. Jel, hemoglobin ile etkileşime giren negatif yüklü kısımları içerir. 25 ila 35 dakika sonra, GHb HbA'nın katodik tarafında ayrılır. 415 nm'de dansitometride taranarak miktar tayini yapılır [53].

İmmünoassay: İmmünohibisyon prensibi ile immünolojik test, ELISA'daki gibi antikorların fraksiyonu inhibe etmek için kullanıldığı bir yöntemdir. HbA1c'yi belirlemek için bu antikorlar kullanılmaktadır [53].

Lateks ile geliştirilmiş immünoassay: HbA1c için lateks ile geliştirilmiş immünolojik test, lateks boncuklar üzerine kaplanmış antijen molekülleri (HbA1c) ve HbA1c'ye özgü antikorlar arasındaki etkileşime dayanır [56], [57]. Bu çapraz

bağlanma reaksiyonu değişikliklere neden olmaktadır. Bu durum numunelerdeki antijen miktarıyla orantılıdır. HbA1c % 2.0 - % 16.0 aralığında doğrusal sonuç vermiştir [3].

Tipik bir yöntemde glikoza ve β -zincirinin ilk 5 ila 10 amino asidine spesifik bir antikor (genellikle monoklonal) kullanır. Bu antikor lateks kaplıdır [56]. Bu topaklaştırıcı, absorbansta artış sağlamak için antikor ile reaksiyona girer. Buradan da HbA1c miktarı hesaplanır. Toplam hemoglobin hemoglobinin soiret absorpsiyon bandında (410nm - 420nm) veya Drabkins yöntemiyle yaklaşık 540nm'de ölçülerek okunur veya alkali hematin tahlili yapılabilir [3].

Enzimatik HbA1c testi: Tek bir kanal testi kullanan ve ayrı bir Hb testine veya hesaplama aşamasına gerek kalmadan doğrudan % HbA1c değerlerini bildiren bir doğrudan enzimatik HbA1c test kitidir [58], [59]. Ayrıca numunelerdeki ortak hemoglobin varyantlarından gelen etkileşimlerden olumsuz olarak etkilenmemektedir. Lizis edilen kan örnekleri proteolitik sindirime tabi tutulur. Glikozlanmış valinler serbest bırakılır ve fruktozil valin oksidaz için substrat görevi yapar. Üretilen hidrojen peroksit, bir kromojen ile horseradish-peroksidaz katalizörlü reaksiyon kullanılarak ölçülür. Enzimatik testin klinik kimya laboratuvarlarında rutin HbA1c ölçümü için uygun ve güvenilir bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır [57]. Ancak yüksek maliyetli bir ölçüm yöntemidir.

2.4 G-HSA Proteini ve Ölçüm Yöntemleri

Glisemik kontrolde kullanılan diğer protein ise serum albüminidir. Serum albümini, HbA1c ölçümlerinin hemoglobin varyantlarından etkilendiği durumlarda, anemi veya böbrek yetmezliği gibi durumlarda güvenilir olarak kullanılmaktadır. Şekil 2. 10'da serum proteini (albumin) yapısı görülmektedir. Hemoglobinde olduğu gibi plazma proteinlerinin (serum albümininin) amino grupları ile glikozun aldehit grubu arasında non-enzimatik glikozillenme meydana gelir ve glikozile serum proteini oluşur. [60].

Glikozile serum proteini (GSP) total GSP veya glikozile serum albümin (GSA) şeklinde ölçülebilir. GSP ve GSA için en yaygın kullanılan ölçüm fruktozamin ölçümüdür. İnsan serum albumininin (HSA) kanda yarılanma ömrü 12-21 gün

olduğu için g-HSA ölçümleri ile son 2-3 haftaya ait glikoz düzeyi belirlenebilmektedir. Serum fruktozamin ölçümü, diyabetik hamileler veya eritrosit yaşamını etkileyen hastalık durumlarında, glisemik durumdaki kısa süredeki değişimleri göstermede kullanılmaktadır. Bu nedenle HbA1c ile yılda 3-4 kez ölçülerek elde edilen bilgiye, fruktozamin ölçülerek her ay ulaşılabilmektedir. GHb ölçümü ile serum fruktozamin birbirini tamamlayabilmektedir.



Şekil 2. 10 Serum proteini (albumin)

G-HSA ölçümünde kullanılan temel yöntemler boranat affinite kromatografisi, imünoassay teknikleri ve enzimatik yöntemlerdir. Son 15-20 yıl içerisindeki çalışmalar yoğun olarak glikozile-albümin ve fruktozamin gibi 2-4 haftalık şeker düzeyini gösteren plazmadaki şeker belirteçleri üzerine yoğunlaşmıştır.

2.5 HbA1c Standardizasyonu

Önceki bölümde anlatıldığı üzere pek çok HbA1c ölçüm metodu mevcuttur. Dolayısıyla her bir ölçüm yöntemi farklı tipte yanıtlar vermektedir. HbA1c sonuçları arasındaki bu farklılığı ortadan kaldırmak için, ABD'de 1996 yılında Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) kurulmuştur. Bu programda sonuçların "Diabet kontrolü ve komplikasyonları testi (DCCT)" ekivalan değer şeklinde verilmesine karar verilmiştir [6], [61]. DCCT metodu, HbA1c'yi ölçen HPLC-katyon exchange metottur [62]. Test sonuçları, Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programının (NGSP) çabaları ile uyumlu olarak Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu Referans Ölçüm Prosedürüne (IFCC-RMP) göre standart hale getirilmiştir [53].

HbA1c'nin global standardizasyonu IFCC tarafından yapılmıştır. Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) ve diğerleri tarafından geliştirilen farklı belirlenmiş karşılaştırma metotları ile değerlendirilmiş ve HbA1c laboratuvar bazlı altın referans metodu kabul edilmiştir [5]. IFCC referans yöntemi HbA1c ölçümü için hassasiyet ve doğruluk sağlayabilse de [63], karmaşık ekipmanların ve sistemi çalıştıracak profesyonel personelin ihtiyacı yalnızca büyük sağlık kuruluşları veya araştırma kurumları için erişilebilirliğini sınırlamaktadır [64]. Bu nedenle, kullanımı kolay ve uygun maliyetli, ancak klinik kullanım için yeterince sağlam yöntemler geliştirmek önem arz etmektedir. HbA1c biyosensörleri uygun hassasiyet, düşük maliyet, basitlik ve minyatürleştirme imkanı olan analitik cihazların tasarımı için büyük potansiyele sahiptir.

IFCC; laboratuvarın NGSP tarafından sertifikalandırılması ve HPLC yöntemine göre kalibre edilmesini şart koşmuştur. HbA1c biriminin mmol/mol olarak verilmesini önermektedir.

Tablo 2. 1 HbA1c'ye dayalı diyabet ve prediyabet teşhisinde kabul edilen sınır değerler [8]

Durum	HbA1c (%) ^a	HbA1c (mmol/mol) ^b
Prediyabet	5.7-6.4	39-47
Diyabet	>6.5	>48

^a: NGSP tarafından önerilen % HbA1c değer sınırları

^b: IFCC tarafından önerilen HbA1c değer sınırları

DCCT ye göre HPLC ile normal HbA1c % 4.0-6.0 (20-42 mmol/mol,) non-diyabetik üst sınır % 5.9 + 2 SD % 6.0'yı (42 mmol/mol) aşmamalıdır. Tablo 2.2'de HbA1c 'nin IFCC standardizasyonu verilmiştir.

Tablo 2.2 HbA1c 'nin IFCC standardizasyonu (66)

NGSP-A1C (%)	DCCT ortalama glikoz (mg/dl)	ADAG ortalama glikoz (mg/dl)	IFCC-A1C (mmol/mol)
5	100	97	31
6	135	126	42
7	170	154	53
8	205	183	64
9	240	212	75
10	275	240	86
11	310	269	97
12	345	298	108

IFCC 'ye ve NGSP'ye göre ortalama glikoz ve HbA1c ilişkisi aşağıdaki denkliklerden kurulabilmektedir.

$$\text{IFCC göre Ortalama Glikoz (mg/dl): } (31.2 \times \text{HbA1c}) + 3.52 \quad [2.1]$$

$$\text{NGSP göre Ortalama Glikoz (mg/dl): } (35.6 \times \text{HbA1c}) - 77.3 \quad [2.2]$$

HbA1c % 1'lik artış ortalama plazma glikozunda 25-35 mg/dl artışa eşdeğerdir.

3.1 Potansiyometri

Potansiyometri; akımın çok az geçtiği veya hiç geçmediği elektrokimyasal sistemlerde, çalışma elektrodunun referans elektroduna karşı iyon derişimine bağı olarak sergilediği potansiyel değışiminin ölçüldüğü bir elektrokimyasal tayin yöntemidir [67], [68].

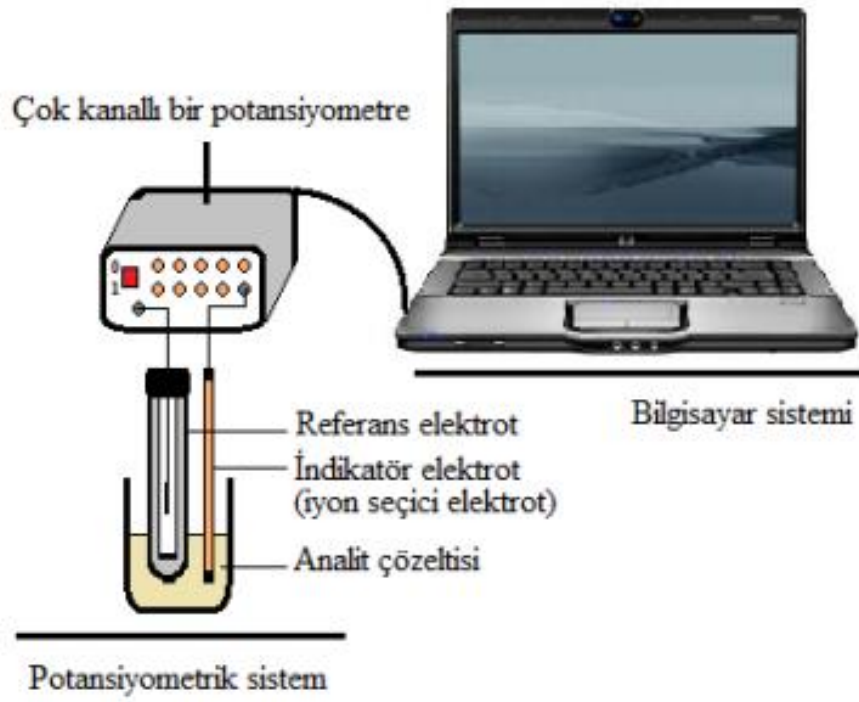
Potansiyometrik bir hücre, referans elektrot olarak adlandırılan karşılaştırma/standart elektrodu (yarı hücre), indikatör elektrot olarak adlandırılan çalışma elektrodu (yarı hücre), tuz köprüsü ve analit çözeltisinden oluşmaktadır [68].

İndikatör elektrot, ölçülmek istenen iyonla karşı seçici olarak hazırlanan içeriğe sahip elektrottur. Referans elektrot ise potansiyeli tam olarak bilinen, analit çözeltisinin içeriğinden bağımsız, sabit elektrot potansiyeline sahip elektrotlardır.

Potansiyometrik sistem, bir test hücresi (elektrolitik çözelti/analit çözeltisi), buna bağlantılı olan indikatör elektrot (değışken potansiyel) ve referans elektrot (sabit potansiyel) ile kararlı bir potansiyometreden oluşur. Şekil 3.1'de potansiyometrik sistem elemanları yer almaktadır.

Bir iyon seçici elektrot hücresi şematik olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir; İç Referans Elektrot / İç Referans Çözelti // İyon-Seçici Membran Elektrot // Test Çözeltisi / Dış Referans Elektrot.

Analit çözeltisine referans elektrot ve indikatör elektrot (genellikle iyon seçici elektrot) daldırılır ve analit çözeltisindeki iyonların derişimine bağı olarak bir potansiyel değışimi meydana gelir. Oluşan bu potansiyel değışimi bilgisayar sistemindeki bir yazılım üzerinden ölçülerek iyonların derişimleri tayin edilebilir.

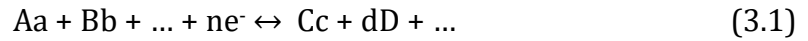


Şekil 3. 1 Potansiyometrik sistem elemanları

3.2 Potansiyometrik Tayin

İyon seçici elektrotlarda, iyon seçici membran iç standart ve numune çözeltisindeki iyonları birbirinden ayırır. Elektronlar, basit iyonlar veya test edilen iyonun yüklü ya da nötral kompleksleri, membranın iç kısımlarına doğru iç standart çözeltinin içeriğiyle orantılı olarak taşınırlar. Böylece oluşan elektrostatik potansiyel (EMF), standart referans elektrot yarı hücresiyle membran elektrot yarı hücresi birleştirilerek ölçülür [69], [70].

Değişim ile elektrot potansiyeli arasındaki ilişki eşitlik (3.1)'deki gibidir.



Eşitlik (2.1)'deki tersinir yarı reaksiyon ele alındığında, bir elektrotun potansiyel farkı (E), Nernst (Nernstian) eşitliğiyle (3.2) verilmiştir. Bu eşitlikten yararlanarak potansiyel değişimlerinden numune çözeltilerindeki iyon değişimleri hesaplanabilmektedir. [69], [71].

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_C a_{D...}}{a_A a_B ...} \quad (3.2)$$

E = Elektrot potansiyeli

E° = Standart elektrot potansiyeli

R = Gaz sabiti, 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹

T = Sıcaklık, kelvin (25 °C için 273,15 K)

F = Faraday sabiti = 96486 J.volt⁻¹

n:=Alınan-verilen elektron sayısı

$$\ln \frac{a_C a_{D...}}{a_A a_B ...} = \text{Elektrotta hissedilen iyon aktiviteleri} \quad (3.3)$$

a_i iyon aktivitesi olmak üzere, eşitlik (3.3) tek bir iyon için yazılırsa, eşitlik (3.4)'teki halini alır.

$$E = E^{\circ} \pm \frac{RT}{nF} \ln a_i \quad (3.4)$$

(±) ; Anyonlar için (-), katyonlar için (+) olur.

Eğer iyon aktivitesi a₁'den a₂'ye değişirse potansiyel değişimi eşitlik (3.5)'deki gibi olur.

$$E = E^{\circ} \pm \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_2}{a_1} \quad (3.5)$$

Eğer ölçümler 25 °C'de alınırsa, sabit sayılar yerine yazıldığında (3.5) eşitliği (3.6) halini alır.

$$E = E^{\circ} \pm \frac{0,0592}{n} \log \frac{a_2}{a_1} \quad (3.6)$$

Eşitlik (3.6) ya göre; 25 °C'de E – log(a) ilişkisinin teorik değişimi n yüklü iyonlar için 59,2/n mV'tur. Bu değişim genel olarak katyonlar için pozitif anyonlar için negatiftir. Dolayısıyla tek yüklü, iki yüklü ve üç yüklü iyonlar için bu değer sırasıyla 59,2, 29,6 ve 19,8 mV'tur [72], [70].

3.3 Referans Elektrotlar

Elektrot potansiyeli tam olarak bilinen, numune çözeltisinin içeriğinden bağımsız sabit elektrot potansiyeline sahip elektrotlara referans elektrot/karşılaştırma elektrodu denir. Referans elektrotların potansiyeli, analit çözeltisine bağlı değildir ve incelenen çözeltide bulunan analitin veya diğer iyonların derişiminden etkilenmez. Ancak sıcaklık değışmelerinde, referans elektrotların potansiyelleri bir miktar değışebilmektedir.

Referans elektrotlar şu özelliklere sahip olmalıdır:

- Kolay kullanılabilmesi, laboratuvar ortamında kolaylıkla hazırlanabilmelidir.
- Küçük akımların geçmesiyle potansiyellerinde bir değışme meydana gelmemelidir.
- Potansiyelinin sıcaklık değışimlerinden etkilenme katsayısı küçük olmalıdır.
- Potansiyeli zamanla değışmemelidir.
- Doğru ve tekrarlanabilir ölçümler alınabilmelidir.

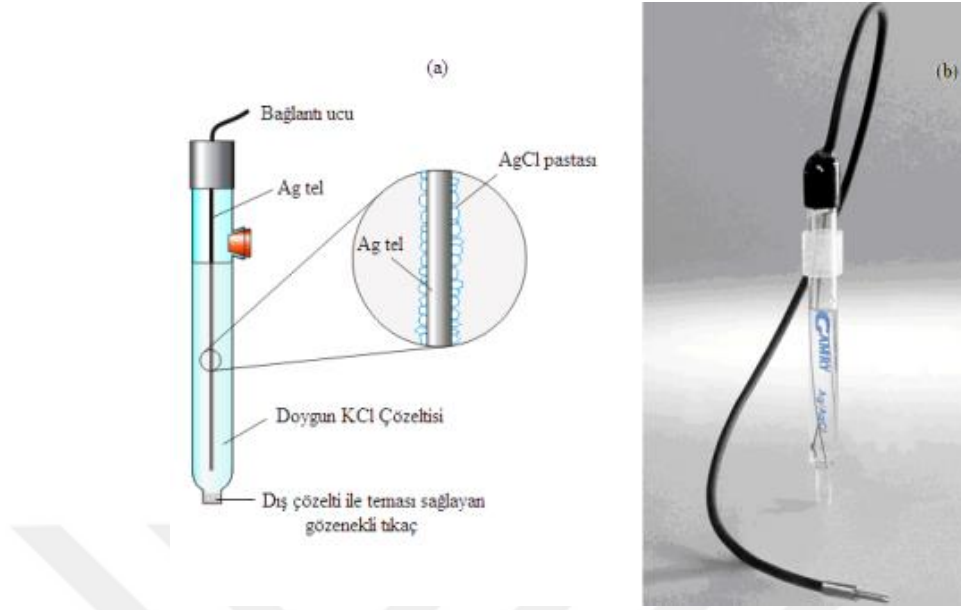
Potansiyometrik ölçümlerde en yaygın kullanılan referans elektrotlar; gümüş/gümüş klorür referans elektrot, kalomel referans elektrot ve standart hidrojen elektrotudur [69]. Bu çalışmadaki potansiyometrik analizlerde gümüş/gümüş klorür referans elektrot kullanılır.

Gümüş/gümüş klorür referans elektrotun kısa açıklaması ve çalışma prensibi aşağıdaki gibidir:

Basit bir gümüş/gümüş klorür referans elektrot Şekil 3.2’de görölmektedir. Doygun KCl çözeltisi ile dolu silindirik bir boru içerisinde gümüş tel olan, uç kısmı gözenekli bir tıkaçla kapatılmış kalem şekline ve boyutlarına benzer şekilde hazırlanmış elektrotlardır.

Gümüş/gümüş klorür referans elektrodu genellikle bir gümüş veya platin tel yüzeyine gümüş klorür kaplanmasıyla hazırlanır. Elektrotun hücre ile ilişkisini gözenekli bir cam sağlar. Yukarıdaki şekilde (a); gümüş/gümüş klorür elektrodun genel yapısını (b); ticari bir gümüş/gümüş klorür elektrotu göstermektedir.

Gümüş/gümüş elektrot reaksiyonu eşitliği şu şekildedir:



Şekil 3. 2 Gümüş/gümüş klorür referans elektrot

Yukarıdaki reaksiyonda potansiyel, Cl^- iyonu derişimine bağlıdır. Aşağıdaki eşitlikte Cl^- iyonu derişimine bağlı olarak değışen potansiyel değışimini gösterilmiştir.

$$E = E^{\circ}_{\text{AgCl/Ag}} - \frac{0,0592}{n} \log \text{Cl}^- \quad (3.8)$$

Elektrot potansiyeli, klorür derişimine bağlıdır. Elektrotta indirgenme veya yükseltgenme tepkimeleri sonucu oluşabilecek potansiyel değışimini ortamda bulunan potasyum klorür tampon görevi yaparak engellemektedir. Gümüş/gümüş klorür referans elektrot 275 °C'ye kadar kullanılabilir.

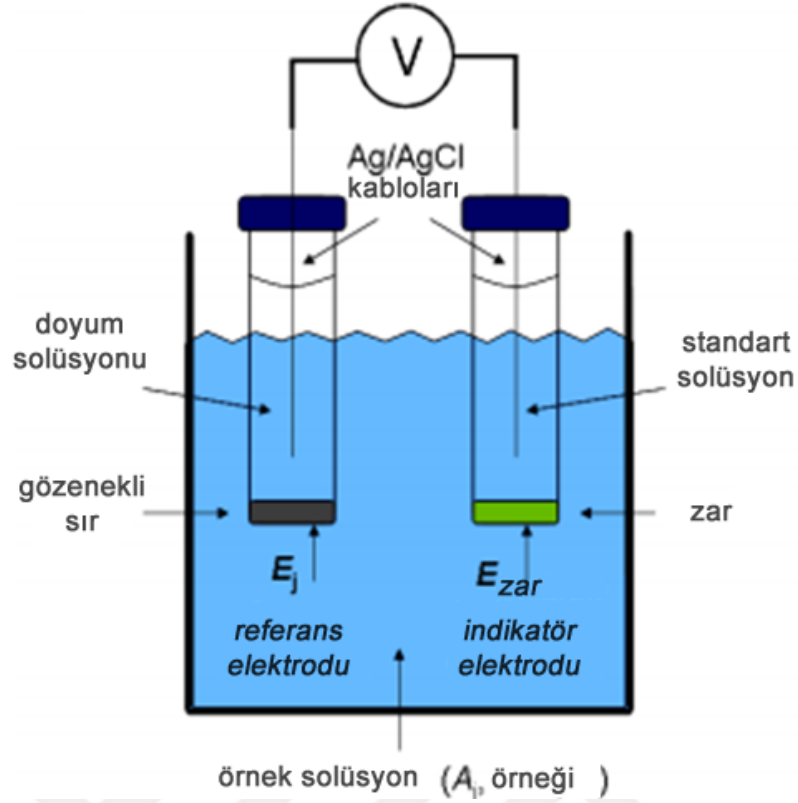
En çok tercih edilen referans elektrot tipi gümüş/gümüş klorür referans elektrotudur.

Diğer referans elektrotlara karşı bazı avantajları şu şekildedir: Kalomel elektrotta civa kullanılır. Civa oldukça zehirlidir. Ayrıca çok küçük ebatlarda gümüş/gümüş klorür referans elektrot hazırlanabilmektedir. Bununla birlikte, gümüş/gümüş klorür referans elektrottun en büyük dezavantajı; dış çözelti ile teması sağlayan gözenekli tıkacın çözünmeyen gümüş kompleksleri ile tıkanma durumudur.

3.4 İyon Seçici Elektrotlar

Birçok iyonun yanında tek bir iyonla duyarlı ve seçici cevap sergileyen elektrotlara “iyon seçici elektrotlar (ISE)” denir [73]. Hiçbir elektrot sadece tek bir iyonla cevap vermez, fakat bir iyonla karşı bilinen bir seçicilik gösterir. İyon seçici elektrotlar, serbest iyonun aktifliğine duyarlıdır. İyonik şiddet sabit tutulursa; derişim aktiflikle doğru orantılı olduğundan iyon seçici elektrotlar ile çözelti içerisindeki iyon derişimleri bu prensibe bağlı olarak ölçülmüş olur [70]. İyon seçici elektrotlar (ISE), belirli bir iyonu içeren bir çözeltiye yerleştirildiğinde yanıt veren (potansiyel üreten) bir gösterge elektrotudur. Günümüzde belirli katyonlara, anyonlara ve bazı gazlara seçici olarak yanıt veren çok çeşitli iyon seçici elektrotlar vardır; pH elektrotları bugüne kadar en iyi bilinenlerdir. Bunlar kimyasal analizlerde birçok farklı uygulama için kullanılabilmektedirler. Şekil 3.3’de potansiyometrik ölçüm için hazırlanmış tipik bir elektrokimyasal hücre yer almaktadır. Referans elektrot (yarı hücre) ile birlikte iyon seçici bir elektrottan (yarı hücre) ve ilgili iyonu içeren bir numune çözeltisinden oluşmaktadır.

Tüm ISE’lerin tasarımlarının temel bir özelliği vardır: iyon algılayıcı kısım ve analit iyonunu adsorbe edebilen yapıya sahip bir zardan/membrandan (plastik, cam veya iyonik kristal olabilir) oluşur. Membranın her iki tarafında da ilgilenilen iyon içeren bir çözelti bulunur: bunlardan biri test-numune çözeltisidir, diğeri elektrotun içinde standart bir çözeltidir. Elektrot gövdesinin içinde de membrandan gelen yanıt izlemek için bir elektrik bağlantısı (bakır/gümüş tel) bulunmaktadır. İyon adsorbe edebilen membran, analit iyonlarının dengeye gelene kadar bağlanabileceği bir yüzeye sahiptir. Çözeltideki iyon konsantrasyonu arttıkça, bu iyonlar daha fazla alan işgal edeceklerdir. Dolayısıyla elektrot farklı bir çözeltiye yerleştirildiğinde, adsorbe edilebilen iyonların sayısı da değişecektir. Membranın iç ve dış yüzeyindeki iyon farkı, aşağıdaki Nernst denkleminde gösterildiği gibi, iki çözelti arasındaki konsantrasyon farkıyla orantılı bir sonuç yaratmaktadır. Nernst denklemi de bu sonucu sayısal bir ifadeye dönüştürmektedir. Nernst denklemi potansiyometrik tayin başlığı altında açıklanmıştır.



Şekil 3. 3 Potansiyel ölçümü için tasarlanmış bir elektrokimyasal hücre örneği [74]

İyon Seçici Elektrotların Avantajları:

İyon seçici elektrotlar, kimyasal analizin tüm alanlarında kullanılır. En yaygın kullanılanı serbest H^+ 'ya cevap veren pH elektrotudur. Diğer yaygın kullanılan elektrotlar florür, nitrat, kalsiyum, klorür, sodyum ve karbon dioksit için geliştirilen elektrotlardır.

İSE analizlerinin en önemli avantajları şunlardır:

- Ucuzluk
- Taşınabilirlik
- Az miktarda numune ve sarf malzeme ile çalışma
- Geniş çalışma aralığı - genellikle 1×10^{-1} - 1×10^{-9} M
- Çok küçük numuneleri analiz edebilme
- Zor türleri analiz etme yeteneği: örneğin H^+ ve florür, diğer metotlarla düşük seviyelerde kolayca analiz edilememiştir [75].

Son otuz yılda iyon seçici elektrotların geliştirilmesiyle son derece hassas analitik ölçümler alınabilir hale gelmiştir. Bu elektrotlar çevre, gıda, sağlık, tıp ve biyokimyasal alanlarda analiz için yaygın olarak kullanılırlar.

İyon Seçici Elektrotların Dezavantajları:

- Spesifiklik sorunu: Elektrot diğer iyonlara da cevap verebilmektedir,
- Yavaş cevap süresi: Bazı durumlarda okumalar on dakikaya kadar çıkabilmektedir,
- Sınırlı kullanım ömrü
- Serbest iyonlara sınırlı cevap: kompleksleşmiş veya başka şekilde bağlanmış iyonlar herhangi bir cevap vermeyebilirler,
- İyon aktivitesinin verdiği cevap doğrudan konsantrasyon ile ilişkilendirilemeyebilir: aynı analit konsantrasyonuna sahip iki çözeltiden gelen cevap farklı arka plan seviyelerinden dolayı farklı yanıtlar verebilmektedir,
- Sınırlı doğruluk- hassasiyet: pH elektrotu dışında, diğer ISE'lerde doğruluk payı $\pm\% 5$ 'ten fazla değildir. Bazı elektrotlar diğerlerinden daha az sorun yaratırken bazı örnekler de daha az soruna neden olur.

Bir İSE'yi kullanma kararı durum bazında değerlendirilmelidir. Kullanım kolaylıkları saha testleri için vazgeçilmez görülmektedir. Çelik, bakır veya çinko gibi alaşım elementlerinin doğru analizi için atomik absorpsiyon spektrofotometresi daha iyi bir seçim olacaktır. Örneğin sütteki kalsiyum için kullanılan bir ISE, atomik absorpsiyon spektrofotometresi kadar iyi sonuç verebilir, ancak kalsiyumun serbest bırakılması için numunenin ön işlemden geçirilmesi gerektiği de unutulmamalıdır [74].

Hızlı cevap veren ISE'ler, potansiyometrik titrasyonlarda gösterge elektrotları olarak kullanılır. Genellikle Ca ve Cl seçici elektrotlar da bu amaç için kullanılmaktadır.

İyon Seçici Elektrot Türleri:

İyon seçici elektrotlar genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır [75]:

1. Cam iyon seçici elektrotlar.

2. Kaplama tel elektrotlar.
3. Katı hal iyon seçici membran elektrotlar.
 - A- I. Sınıf elektrotlar.
 - B- II. Sınıf elektrotlar.
 - C- III. Sınıf elektrotlar.
4. Sıvı hal iyon seçici elektrotlar.
5. Gaz ve enzim elektrotlar.
6. İyon seçici alan etki transistörleri (ISFET, MOSFET).
7. Sıvı membran iyon seçici elektrotlar (polimer membran elektrotlar).
8. Kompozit elektrotlar.

Bu çalışmada kompozit iyon seçici bir elektrot geliştirilmiştir. Kompozit elektrotlar 1980'li yıllarda üretilmeye başlanmıştır. Bu tür elektrotlara "non-konvensiyonel katı hal iyon seçici elektrotlar" da denilmektedir. Bu elektrotlar karbon ve polimerik inert bir matriks içine organik veya inorganik iyon değişim reçinesinin doldurulması ile hazırlanmaktadır. Minyatürize edilebilirler ve uzun kullanım ömürleri vardır [70].

3.5 İyon Seçici Elektrotların Performans Özellikleri

Cevap zamanı: IUPAC tanımına göre cevap zamanı; dedektör çıktısının başlangıç değerinin belirli yüzdelere (örneğin % 90 ila % 10) arasında değişmesi için gereken zamandır[99]. Cevap zamanını etkileyen faktörler şunlardır:

- Aktif maddeye (ligant veya kompleks) çözeltideki iyonun tutunma hızı,
- İyon ekstraksiyon kapasitesi,
- Difüzyona karşı direnç,
- Membran kalınlığı
- Membrandaki çözücünün polaritesi.

Cevap zamanını azaltmak için; Etkili karıştırma (veya akış hızının artırılması) yapılabilir. Membran yüzeyinden kirliliklerin uzaklaştırılması veya çok küçük membran yüzeyli mikroeletrotlar kullanılması sağlanabilir veya ölçümlerin, derişimi düşük çözeltilerden yüksek çözeltilere doğru yapılması sağlanabilir.

Seçicilik: Ölçüm ortamında bir elektrodun seçtiği iyonların dışında farklı iyonların bulunması elektrot performansını önemli ölçüde zayıflatır. Bu farklı iyonların girişimi, elektrot membranının yapısına bağlı olarak çeşitli şekillerde olabilir.

Potansiyometrik seçicilik sabitleri, karışık çözelti metodu ve ayrı çözelti metodu olmak üzere iki temel yöntemle hesaplanabilir [76], [77]. Karışık özelti metodları dört ana grupta toplanmaktadır. Bunlar: Sabit girişim (fixed interference) metodu, iki çözelti (two solution) metodu, sabit ana iyon (fixed primary ion) metodu, potansiyel eşitleme (matched potential) metodu olarak adlandırılmaktadır. Bu çalışmada ayrı çözelti metodu kullanılarak seçicilik katsayısı hesaplanmıştır. Bu nedenle ayrı çözelti metoduna değinilmiştir.

Ayrı özelti metoduyla seçicilik katsayısı iki farklı şekilde hesaplanabilir; ISE ve referans elektrottan oluşan hücrenin potansiyeli iki ayrı çözelti için ölçülür. İlk özeltide a_A aktivitede A iyonu bulunurken, hiç B iyonu bulunmaz. Bu çözeltinin ölçülen potansiyeli E_A 'dır. İkinci özeltide ise ilk çözeltideki iyonunun aktivitesine eşit aktivitede B iyonu (a_B) bulunurken, A iyonundan hiç bulunmaz. Bu çözeltinin ölçülen potansiyeli E_B 'dir [70].

ISE'lerdeki $\log a$ ve E arasındaki ilişki ana iyon için elde edilmektedir. Eşit iyon aktivitesi olduğu durumlarda aşağıdaki eşitlik kullanılarak seçicilik katsayısı hesaplanabilmektedir [77]:

$$\text{Log } (K_{i,j}) = (E_B - E_A) zF / 2,303 RT \quad (3.9)$$

R =Gaz Sabiti: 8.314 J/mol K

F =Faraday Sabiti: 96.500 Coulomb/mol

T =Mutlak Sıcaklık: 298K

z : ana iyon yükü: -2 ($B_4O_7^{2-}$)

Diğer yöntemde ise $E_A = E_B$ durumu dikkate alınır ve aşağıdaki eşitlik yardımı ile ayrı çözelti metoduna göre seçicilik katsayısı hesaplanabilir [76], [77]:

$$K_{A,B}^{pot} = a_A / (a_B)^{z_A/z_B} \quad (3.10)$$

Tayin limiti: Membran ara fazında ölçülebilir bir potansiyel farkı oluşturan en düşük iyon derişimidir [78].

Tekrarlanabilirlik: Farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerde elektrodun yıkandıktan sonra tekrar çözeltilere daldırılmasıyla sergilediği bir seri potansiyel değerlerinin standart sapması olarak tanımlanmaktadır [79].

Çalışma Ömrü: Elektrotların kullanım ömürleri Nernst cevabı sergiledikleri süre olarak değerlendirilmektedir. Elektrotların kullanım ömürleri on katlık konsantrasyon değişiminde belirli periyotlarla sergiledikleri potansiyel farklar incelenerek belirlenir. Ölçülen bu potansiyel farklarla zamana karşı grafikler oluşturulur. Eğimde, önemli bir farkın meydana gelmediği süre kullanım ömrü olarak belirlenir [80].

Doğrusal çalışma aralığı: Çizilen kalibrasyon grafiklerinden hesaplanabilir. Doğrusal çalışma aralığı, kalibrasyon eğrisinde veri noktalarının doğrusallıktan maksimum 2 mV saptığı aralık olarak tanımlanır. Potansiyel değişiminin doğrusallığı R^2 değeri ile verilebilir. [81], [70].

pH çalışma aralığı: Tampon çözeltilerin potansiyelleri ölçülür ve pH'ya karşı grafiğe geçirilir. Potansiyelde önemli bir değişimin meydana gelmediği pH aralığı elektrodun pH çalışma aralığı olarak belirlenir [70].

3.6 İyon Seçici Elektrot Uygulamaları

İyon seçici elektrotlar aşağıdaki uygulamalarda sıklıkla kullanılır:

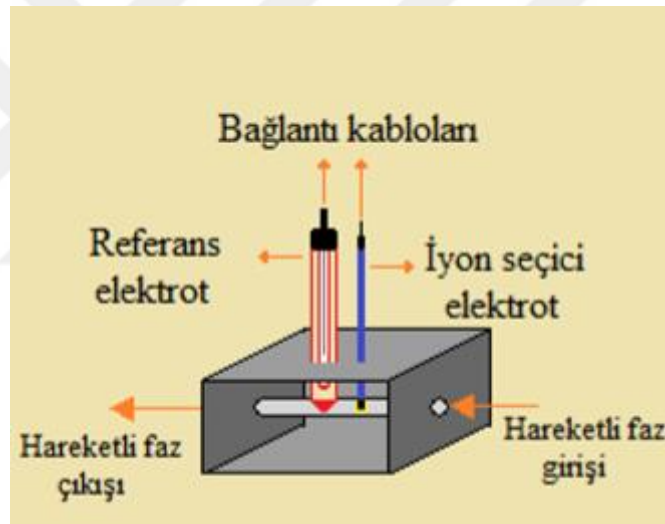
a. Doğrudan ölçümler: Analit derişimlerini doğrudan ve seçimli olarak ölçmek için kullanılırlar. Bu yöntem ölçümü yapılan bir iyonun konsantrasyonuna karşı elde edilen potansiyelin grafiğe geçirilmesiyle alınan kalibrasyon eğrisini içerir. Ayrıca başka bir doğrudan ölçüm yöntemi de standart ekleme yöntemidir. Bu yöntem, bilinen hacimdeki bir analit çözeltilisine standart çözeltinin bilinen hacimlerinin eklenmesinden sonra elektrot sisteminin potansiyelinin tayinine dayanır [69].

b. Potansiyometrik titrasyonların dönüm noktalarının tayini: Potansiyometrik titrasyonlar, titrant hacminin fonksiyonu olarak bir iyon seçici elektrot ile potansiyel değişiminin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Kimyasal indikatörlerin

kullanıldığı titrasyonlardan elde edilen verilerden daha makul sonuçlar verirler ve özellikle renkli veya bulanık çözeltilere de uygulanabilme avantajları vardır.

c. Denge sabiti ve buna bağlı fiziksel sabitlerin hesaplanması: Çözünürlük çarpımı sabitleri (K_c), iyonlaşma sabitleri (K_i , K_a , K_b) ve oluşum sabitleri (K_f) için sayısal değerler kolayca elde edilebilir.

d. Hareketli ortamlarda (akış enjeksiyon sistemlerde) dedektör olarak kullanımı: PVC temelli ve iç referans çözeltinin kullanılmadığı katı-hal kontakt tipi sıvı membran iyon seçici elektrotlar, akış enjeksiyon sistemlerde potansiyometrik dedektör olarak kullanılmaktadır. İyon kromatografi tayinlerinde de iyon seçici elektrotlar sıklıkla kullanılmaktadır [82]. Şekil 3.4’de potansiyometrik akış hücresi içinde dedektör olarak kullanılan iyon seçici elektrot ve referans elektrot gösterilmiştir. Bu akış hücreleri çok küçük hücre hacmine sahiptir ($\leq 5,0 \mu\text{L}$) [70].



Şekil 3. 4 Akış enjeksiyon sistemde kullanılan tipik bir akış hücresi

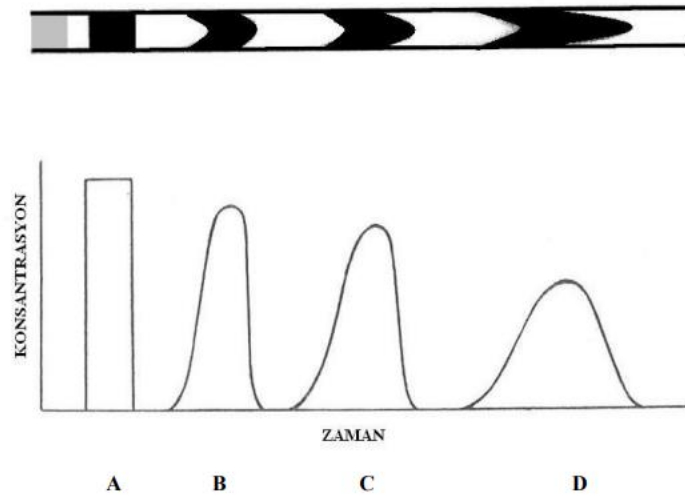
4.1 Akış Enjeksiyon Analizi

Akış enjeksiyon tekniği ilk kez Danimarka'dan Hansen ve Ruzicka, Amerika Birleşik Devletleri'nden Stewart tarafından geliştirilmiştir [83]. Ruzicka ve arkadaşları akış enjeksiyon sistemini şu şekilde açıklamışlardır: Uygun bir akış ortamında sıvı numunenin enjeksiyonunun sürekli akış şeklinde yapıldığı bir metottur. Enjekte edilen sıvı bir alan oluşturarak sürekli olarak dedektöre gönderilerek absorban, elektrot potansiyeli veya diğer fiziksel parametrelerin ölçümü yapılır [84].

Akış enjeksiyon analizi, FIA, 1970'lerin ortalarından itibaren analitik kimya laboratuvarlarında çok popüler bir teknik haline gelmiştir [84], [70]. Bunun temel nedenleri arasında göreceli basitliği, yüksek numune verimi ve nispeten düşük maliyeti gösterilebilir. İlk yıllarda FIA, mevcut ıslak kimyasal analizleri, örneğin amonyak ve fosfatın belirlenmesini otomatikleştirmek için kullanılmıştır [85], [86], [87]. Akış enjeksiyon tekniği, günümüzde çok daha geniş bir uygulama alanına sahiptir; sensörler ve elektrotlar için otomatik bir çözelti işleme sistemi olarak da kullanılmaktadır. Akış enjeksiyon sisteminin genel avantajları hassaslık, seçicilik, ekonomik olması ve kolay uygulanabilirliktir [88].

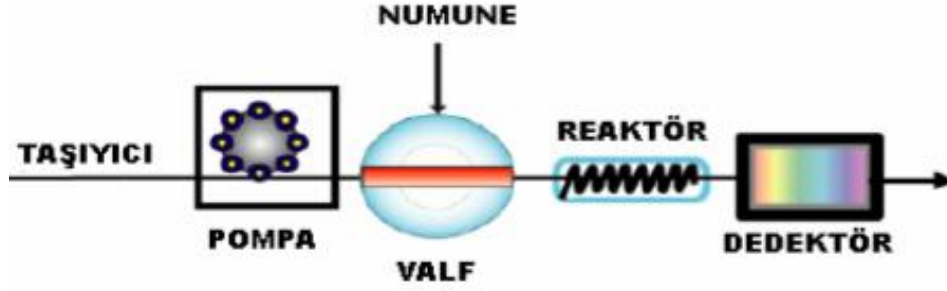
FIA, pH veya iletkenlik ölçümünden kolorimetre, titrasyonlar ve enzimatik analizlere kadar çeşitli görevler için geçerli olan genel bir çözelti işleme tekniğidir. Herhangi bir FIA sistemini doğru bir şekilde tasarlamak için, analiz edilecek materyalin (fiziksel-kimyasal) özelliklerini dikkate almak gerekir. Örneğin pH ölçümü için veya atomik absorpsiyon için, orijinal numune kompozisyonu ölçüleceği zaman, numune FIA kanalı içinden ve akış hücresine seyreltilmemiş bir biçimde yüksek oranda tekrarlanabilir bir şekilde taşınmalıdır. Ancak spektrofotometri gibi diğer tayin yöntemlerinde, analit belirli bir dedektör tarafından ölçülebilen bir bileşiğe dönüştürülmelidir. FIA kanalı boyunca enjekte edilen numunenin reaktiflerle reaksiyona girerek saptanabilir miktarda ürününün oluşabilmesi için yeterli akış yolu uzunluğu oluşturulmalıdır [89].

Akış enjeksiyon tekniği üç ana faktöre dayanmaktadır. Bunlar, tekrarlanabilir enjeksiyon, tekrarlanabilir reaksiyon süresi ve kontrollü dispersiyondur [90]. Kontrollü dağılım, dar bir tüp içinde taşınırken laminar akış ve sıvıların moleküler difüzyonundan kaynaklanır [87]. Bu kontrollü dispersiyonun bir sonucu olarak, belirli bir akış enjeksiyon sisteminde enjekte edilen her numune aynı şekilde enjekte edilir ve bu nedenle yüksek oranda tekrarlanabilir sonuçlar elde edilir. Homojen karıştırmaya gerek yoktur ve kimyasal reaksiyonların bulunduğu durumlarda, numunede analit için reaksiyon hızını değiştirebilecek hiçbir matris bileşeni olmadığı sürece reaksiyonun tespit edilmeden önce dengeye ulaşması gerekli değildir [87]. Şekil 4.1’de akış enjeksiyon sisteminde numunenin aldığı yol boyunca dedektörde kaydedilen pikler görülmektedir. Numune taşıyıcı faz içinde dağıldıkça piklerin genişliği artmaktadır.



Şekil 4. 1 Akış enjeksiyon sisteminde numunenin aldığı yol

Temel düzeyde tasarlanan bir akış enjeksiyon sistemi pompa, valf, reaktör/ ayırım kolonu ve dedektörden oluşmaktadır. Dedektör kaydı, bir bilgisayar yazılımı ile bilgisayar ekranında pikler şeklinde okunabilmektedir. Şekil 4.2’de tipik bir akış enjeksiyon sistemi elemanları gösterilmiştir. Bir akış enjeksiyon sistem, örneklemenin yapıldığı enjeksiyon valfleri, itme kuvvetinin oluşturulduğu peristaltik pompa, ayırım kolonu/reaksiyon kolonu/reaktör ve bağlantı tüpleri ve dedektörden oluşur.



Şekil 4. 2 Tipik akış enjeksiyon analiz sistemi elemanları

- **Enjeksiyon valfi:**

Enjeksiyon valfinin temel işlevi, hareketli faz içinde numunenin hacim kaybına uğramadan sisteme girişini sağlanmasıdır. Bu temel görevlerinin yanında enjeksiyon valfleri reaktifin numuneye enjeksiyonu, kolon kullanarak önzenginleştirmenin yapılması ve taşıyıcı tüpler ile akış yönünün değiştirilmesi gibi farklı işlevlere de sahiptir [88].

- **Peristaltik pompa:**

Peristaltik pompalar çok yönlü itme kuvveti sağlar. Peristaltik pompalar farklı akış sistemlerinde de kullanılmaktadır. Paralel pompa tüpleri sayesinde çok kanallı özellik sunabilmektedirler. Ancak bazı dezavantajlara sahiptirler [88]; yüksek titreşimlerinin olması, uzun süreli kullanımda akış-oranının kararsızlığı gibi.

- **Reaktör/Ayrım kolonu/Reaksiyon Kolonu:**

Reaktör olarak da adlandırılan ayırım kolonu veya reaksiyon kolonu akış enjeksiyon sistemde yapılan analizlerde hedef türün dedektör tarafından dedekte edilebilir bir türe dönüştürülmesi gerektiği durumlarda kullanılmaktadır. Dedekte edilebilecek bir ürün oluşturabilmek için akış sırasında numune ve reaktant reaksiyona sokulur. Numune ve reaktant akış süresinde ya tamamen reaksiyona girmez veya reaksiyon sırasında numune ve reaktant düzgün bir dağılım oluşturmaz. Böyle durumlarda reaksiyon hücreleri kullanılır. Kullanılan reaksiyon hücrelerinin şekli ve büyüklüğü reaksiyonun hızına bağlı olarak ve düzgün bir dağılım oluşması için çok önemlidir [91]. Peristaltik pompa çok yüksek basınç sağlamadığından kullanılan ayırım

kolonunun da uygun sağamlıkta olması yeterlidir. Piyasada çeşitli boyutlarda ve şekillerde kolon çeşitleri vardır.

PTFE (politetrafloroetilen) tüpler 0.35-1.0 mm çapında olup, inert ve yarı saydam özelliklerinden dolayı kolon olarak sıklıkla kullanılırlar. Tüp duvarlarının sağam olabilmeleri için 0.5 mm'den daha ince olmamalıdırlar [83].

4.2 Akış Enjeksiyon Sisteminin Çalışma Prensibi

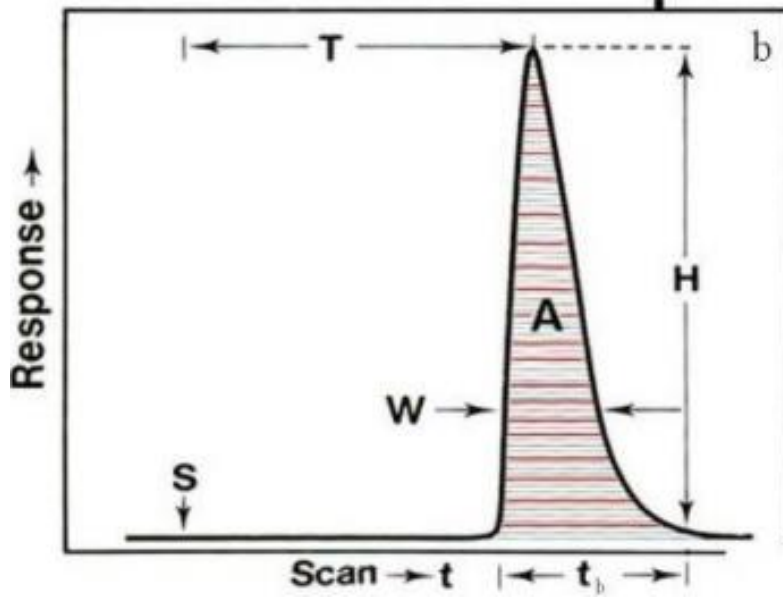
Numune uygun bir taşıyıcı faz içine enjekte edilir. Numune akış yönünde ilerler ve taşıyıcı içinde dağılmaya başlar. Dağılan numune taşıyıcı faz yardımıyla dedektöre iletilir. Dedektör analitin içeriğine bağlı olarak kolorimetrik absorbans ya da floresans gibi fiziksel parametre değişimlerini kaydeder [83].

Eğer analit, dedektör tarafından dedekte edilebilir bir formda değilse; taşıyıcı içine numune enjekte edilerek akış yoluna verilir. Bu şekilde numune akış yönünde ilerler ve reaktantla birleşir. Reaktant içinde dağılır ve istenen dedekte edilebilir formda ürün reaktantla numune arasındaki ara yüzeyde oluşmaya başlar. Oluşan ürünreaktif yardımıyla dedektöre iletilir. Dedektör de fiziksel parametre değişimlerini kaydeder [83]. Şekil 4.3'de örnek bir dedektör kaydı yer almaktadır. Şekil 4.3'deki dedektör kaydında analog çıkış bir tepe biçimine sahiptir, dedektör kaydı S'den başlar (enjeksiyon zamanı). H, pik yüksekliğidir. W, seçilen bir seviyedeki pik genişliğidir ve A, pik alanıdır. T, pik yüksekliği ölçümüne karşılık gelen kalma süresidir.

4.3 Dağılma Katsayısı ve Dağılmayı Etkileyen Faktörler

Dar çaplı tüpler boyunca hareketli fazın akışıyla reaktif ve örnek bölgesi arasındaki hareketli fakat tekrarlanabilir karışma, dağılma olarak tanımlanmaktadır [70], [92]. Akış enjeksiyon analizindeki dağılma tekrarlanabilir ve kontrol edilebilirdir.

Dağılma sayesinde analit ve reaktif arasındaki kimyasal etkileşim artar, böylece duyarlılık da artmış olur ancak seyrelmenin artmasına yol açarak da duyarlılığın düşmesine pik genişlemesine ve örnekleme sıklığının azalmasına neden olur [70], [93], [94].



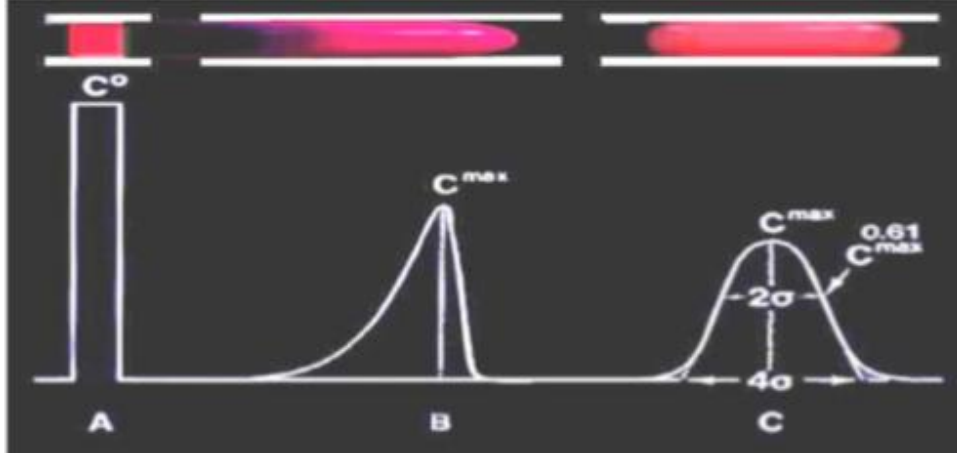
Şekil 4. 3 Örnek bir dedektör kaydı [89] .

Akış enjeksiyon analiz tekniğinde iki tip dağılma vardır: radyal ve eksenel. Şekil 4.4’de bu dağılma tipleri gösterilmektedir. Radyal dağılma (akış yönüne dik) akışkanın akış modelinden kaynaklanır: Radyal dağılma daha düşük seyrelme ve pik genişlemesine neden olurken akış yönündeki ani ve sık olarak meydana gelen değişiklikler ise radyal dağılmayı artırır. Eksenel dağılma (akış yönüne paralel) ise, akış yönünde meydana gelir ve radyal dağılmadan daha fazla seyrelmeye ve pik genişlemesine neden olur [94], [93].

Dağılma katsayısı aşağıdaki denklikle hesaplanır [83], [88].

$$D = C_0 / C_{max} \quad (4.1)$$

D, dağılma katsayısıdır. Co, başlangıçtaki analit çözeltisinin taşıyıcı faz içine enjekte edildiği andaki konsantrasyonudur. Cmax ise enjekte edilen analit çözeltisinin taşıyıcı sistem içinde ilerlemesi sırasında sistem içinde dağılmasıyla devamlı konsantrasyonu artan ve pikin tepe noktasında maximum konsantrasyonuna ulaşan bir gauss eğrisi oluşturan analit konsantrasyonudur [83].



Şekil 4. 4 Dağılma tipleri [83]

Dağılma, bilinen C_0 derişiminde bir boya çözeltisinin sisteme enjekte edilmesi ve daha sonra bu çözeltinin akış hücresi içindeki absorbansının ölçülmesi ile kolaylıkla belirlenebilir [88].

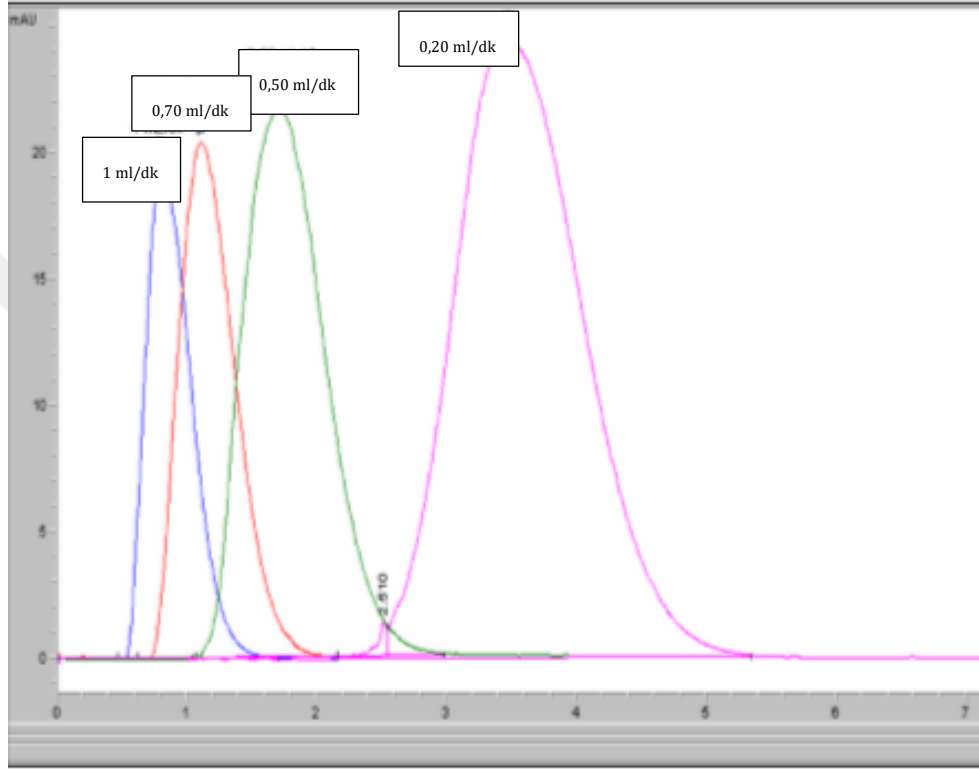
Dağılma katsayısı birimsizdir ve 1'den büyük bir değerdir. D değeri ayrıca çalışılan akışkanın seyrelme faktörünü de verir. $D=2$ örnek çözeltisinin 1:1 oranında taşıyıcı akışkanla seyreltildiğini ifade eder [70].

Dağılma katsayısına göre göre akış enjeksiyon analiz sistemleri üç değişik grupta açıklanabilirler.

- $1 < D < 3$: Sınırlı dağılmalı akış enjeksiyon analiz sistemlerinde olur. Bu tür sistemler gerçek analit konsantrasyonunun taşıyıcı akışkanla seyrelmesinin önlenmesi gerektiği durumlarda kullanılır.
- $3 < D < 10$: Orta dağılmalı akış enjeksiyon analiz sistemlerinde olur. Bu tür akış enjeksiyon analiz sistemleri örnek ile reaktif arasında tam bir karışmanın gerekli olduğu durumlarda kullanılır.
- $10 < D$: Geniş dağılmalı akış enjeksiyon analiz sistemlerinde olur. Bu tür sistemler çok derişik örneklerin derişimlerini dedektörlerin dinamik aralıklarına uydurmak için kullanılır. Örnek-reaktif karışmasının gerekli olduğu durumlarda kullanılır [70], [93], [94].

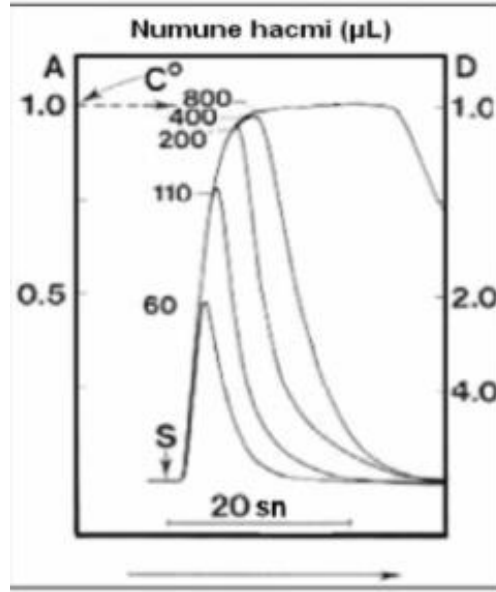
Akış enjeksiyon ve dağılma katsayısına etki eden faktörler: Akış hızı, numune hacmi, akış yolu uzunluğu ve iç çapı, reaksiyon hücresi şekli/tipi, reaksiyon hızı şeklinde sıralanabilir [83], [88], [95], [96].

1. Akış hızı: akış hızı düşürülürse numune bandının dağılması artar. Eğer dağılma ve alıkonma süresi arttırılacaksa akış hızı düşürülmelidir. Şekil 4.5’de farklı akış hızları gösterilmektedir. Akış hızı arttıkça dağılma/pik genişliği azalmaktadır.



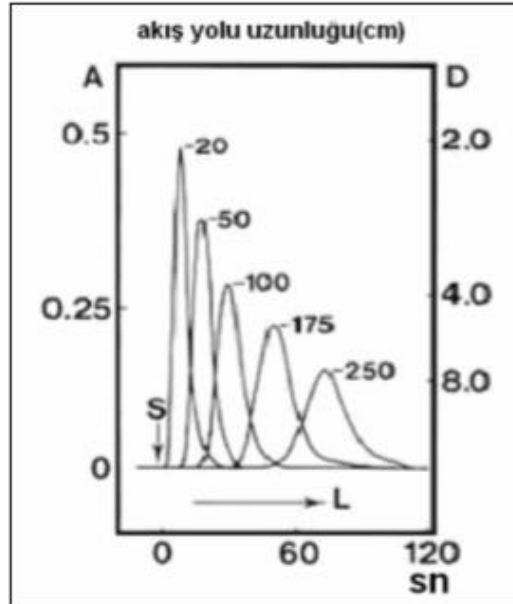
Şekil 4. 5 Farklı akış hızlarının dağılmaya etkisi [83]

2. Numune hacmi: akış enjeksiyon sistemin cevap eğrisi enjekte edilen numune hacminin bir fonksiyonu gibi çalışmaktadır. Eğer numune ile hareketli faz arasında bir etkileşim yoksa enjekte edilen numune hacmi arttıkça dağılma azalır [70]. Bu durumda numunede seyrelme olmaz. Ancak numunenin taşıyıcı veya enjekte edilen reaktiflerle etkileşmesi söz konusu olduğunda bu parametre farklı şekilde işler [97]. Şekil 4.6’da farklı numune hacimlerinin dağılmaya etkisi görülmektedir. Numune hacmi arttıkça pik yüksekliği artmakta, pik genişliği ise azalmaktadır.



Şekil 4. 6 Farklı numune hacimlerinin numune bandındaki dağılmaya etkisi [83]

3.Akış yolu uzunluğu ve iç çapı: akış yolunun uzunluğu arttıkça numune bandının dağılması da artmaktadır. Akış yolu uzadıkça deney süresi de artar [97]. Şekil 4.7’de akış yolu uzunluğunun numune bandındaki dağılmaya etkisi görülmektedir(83). Akış yolu uzadıkça dağılma artmaktadır.



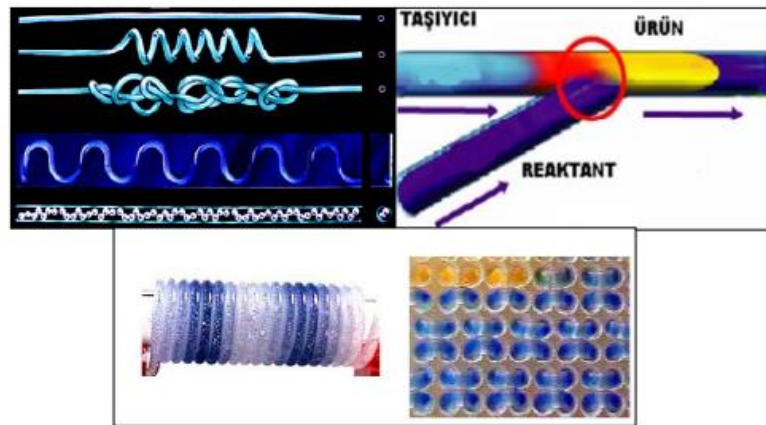
Şekil 4.7 Akış yolu uzunluğunun numune bandındaki dağılmaya etkisi [83]

4.Reaksiyon hücresi tipi: Numune ve reaktant akış süresinde ya tamamen reaksiyona girmez veya reaksiyon sırasında numune ve reaktant tam olarak düzgün bir dağılım oluşturmaz. Bu gibi durumlarda reaksiyon hücreleri kullanılır. Kullanılan reaksiyon hücrelerinin şekli reaksiyonun hızına bağlı olarak dağılmayı etkilemektedir [97].

5.Reaksiyon hızı: Reaksiyon hızı yüksek olan bir analizde dağılma çok fazla olmaz. Ayrıca böyle bir analizde kullanılan reaksiyon hücresi ve akış yolu uzunluğu kısa olur [83].

4.4 Reaksiyon/Ayrım Kolonu ve Tipleri

Akış enjeksiyon analizinde numunelerin reaktant ile tam olarak reaksiyona girmesi/ayrım yapılabilmesi ve tekrar akış içinde simetrik bir dağılımla ilerlemesi için çok çeşitli reaksiyon/ayrım kolonları kullanılmaktadır. Bu ayrım/reaksiyon kolonları düz, örülmüş, helezon şeklinde sarılmış, dalgalanmış şekilde olabilmektedir [83]. Reaksiyon kolonunun şekli farklılaştıkça simetrik bir dağılım gözlemlenmektedir. Ayrıca, bir noktada karıştırma yapan ve reaktant ile numune çözeltisinin reaksiyon kolonunda değil de akış yolu üzerinde reaksiyona sokulduğu sistemler de kullanılmaktadır [97]. Şekil 4.8’de çeşitli şekillerdeki ayrım/reaksiyon kolonları görülmektedir.



Şekil 4. 8 Ayrım/Reaksiyon kolonu tipleri

5.1 Materyal

5.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Bu bölümde sırasıyla borat seçici elektrot hazırlanmasında; glikoz, glikozile hemoglobin, glikozile albumin çözetilerinin hazırlanmasında ve mini ayırım kolonunun dolgu maddesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar verilmiştir.

- Borat seçici elektrot hazırlanmasında kullanılan kimyasallar:

Gümüş borat: 0,1 M gümüş nitrat ve 0,1 M sodyum tetra borat homojenizatör kullanılarak karıştırılıp çöktürülmüş ve etüvde 3 gün kurutularak elde edilmiştir.

Ag₂S: 0,1 M sodyum sülfür ve 0,1 M gümüş nitrat ile çöktürülerek elde edilir ayrıca ticari olarak tedarik edilebilir. Çalışmamızda Sigma marka kullanılmıştır.

Cu₂S: 0,1 M Bakır 1 klorür+ 0,1 M sodyum sülfür ile çöktürülerek elde edilir ayrıca ticari olarak tedarik edilebilir. Çalışmamızda Sigma marka kullanılmıştır.

Katı kontakt: % 50 grafit, % 35 epoksi, % 15 sertleştirici ve birkaç damla THF/akrilik kullanılarak hazırlanmıştır.

Saflaştırılmış tetrahidrofuran (THF): 2-3 spatül benzofenon, balon jojenin yarısına kadar THF, 2-3 parça sodyum metali ince levhalar halinde kesilerek balon jojeye ilave edilip, saflaştırılmıştır.

Epoksi: Ticari olarak temin edilmiştir.

- Glikoz, g-HSA, HbA1c çözetilerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar:

HbA1c ve g-HSA (glikozile-insan serum albümini) ticari olarak temin edilmiştir. (HbA1c: IRMM/Instute For Referrence Materials And Measurument, BCR-405, Human blood haemolysate. g-HSA: Sigma). Glikoz çözeltisi (dekstroz monohidrat) 1×10^{-5} - 1×10^{-1} M olacak şekilde 5 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır.

- Mini ayırım kolonu dolgu maddesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar:

Grafit oksit temelli bir kolon dolgu malzemesi hazırlanmıştır.

100 mg grafit oksit (GO) yaklaşık 1 mikron çapında olup % 90 oranında yüzeyinde karboksil grubu içermektedir. 0.5 ml karbodiimid/n-hidroksisüksinamid (1:1 w/w), 80 mg APBA, 200 mg L-askorbik asit, 0.1 mol/l'lik hidroklorik asit (HCl) kullanılmıştır.

5.1.2 Kullanılan Cihazlar

Çözeltilerin ve kompozitlerin hazırlanmasında hassas terazi, ultrasonic homojenizatör (ultrasonic cell crusher), su banyosu, manyetik karıştırıcı, santrifüj, etüv ve ultrasaf su cihazı kullanılmıştır.

Çalışılan çözeltilerin pH ölçümü Microcomputer pH/Conductivity/Temp Meter 6307 marka pH ölçüm cihazı ile yapılmıştır.

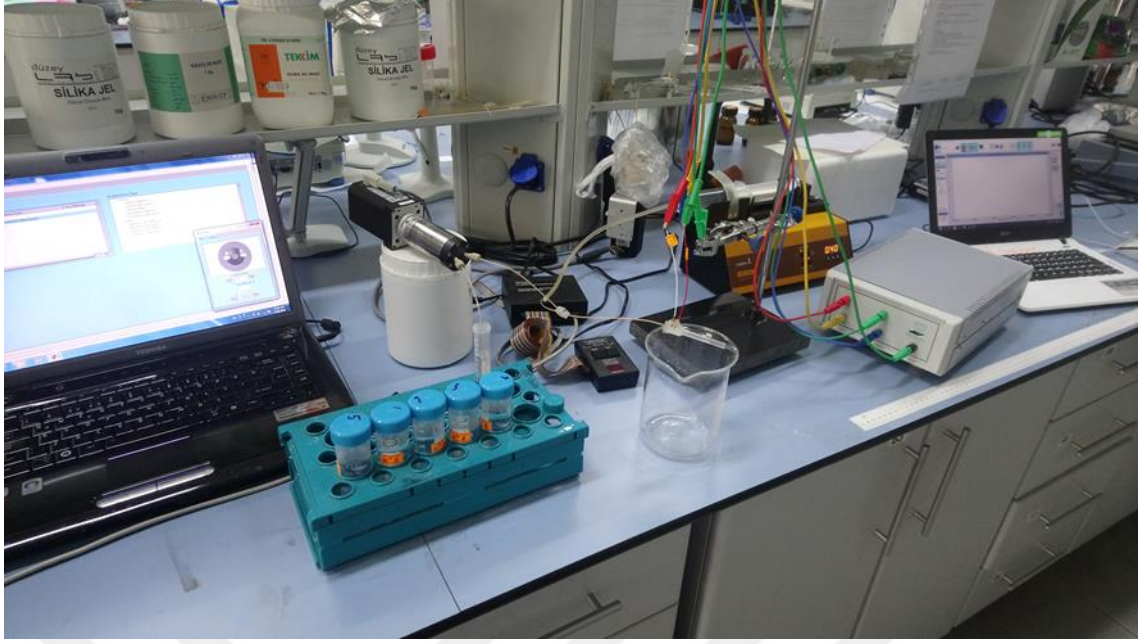
Geliştirilen kompozit iyon seçicici elektrotun potansiyometrik ölçümleri MEDİSEN marka dört kanallı potansiyometre ile yapılmıştır. ISEMS yazılım programı ile Acer marka dizüstü bilgisayar kullanılmıştır.

Durgun fazdaki potansiyometrik ölçümlerde kullanılan Ag/AgCl referans elektrodu ticari olarak temin edilmiştir. Markası ABD menşeli HANNA INSTRUMENTS'dır. Akış enjeksiyon analiz sistemde Prof.Dr.İbrahim IŞILDAK (Medisen AR-GE) tarafından geliştirilen mini bir Ag/AgCl referans elektrot akış hücresine uygun boyutlarda hazırlanarak hücreye takılmış ve ölçüm alınmıştır.

Akış enjeksiyon sistemde kullanılan peristaltik pompa Global FIA Valco markadır (Vici Miligat Pump), modeli CP-DSM'dir.

Hareketli ortamda numune enjeksiyonu için kullanılan çoklu valf Global FIA Valco Vici markadır. Valf parametrelerini ayarlamak için kullandığımız bilgisayar programı ticari bir yazılımdır ve markası FLZF'dir.

Şekil 5.1'de hareketli ortamda yapılan çalışmalar boyunca kullanılan akış enjeksiyon sistemi görülmektedir.



Şekil 5. 1 Geliştirilen akış enjeksiyon analiz sisteminin genel görünümü

5.2 Metod

Deneyisel çalışmalarımız sırasında kullanılan standart anyon çözeltileri, farklı anyonların sodyum tuzlarından hazırlandı. Böylece anyon çözeltileri için katyon türü sabit tutulmuş oldu. Anyon çözeltilerinin öncelikle hassas bir şekilde her bir çözeltinin derişimi 0,1 M olacak şekilde ultra saf su kullanılarak stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra her bir anyonun stok çözeltileri kullanılarak daha seyreltik derişimlerdeki çözeltileri ultra saf su kullanılarak hazırlandı.

Elektrotlar 6. bölümde yer alan Tablo 6.1’de verilen içeriklere uygun bir şekilde hazırlanarak potansiyometrik sistemde hem durgun fazda hem de hareketli fazla performansları değerlendirilmiştir. Durgun ortam testleri elektrotların doğrudan hazırlanan standart çözeltilere daldırılması ile gerçekleştirilmiştir. Durgun fazda optimum potansiyometrik sinyali veren elektrot belirlenerek akış enjeksiyon sistemde ölçüm alınmak üzere özel olarak tasarlanan akış hücresine yerleştirilmiştir. Akış enjeksiyon sistemde nihai hedef olan kandaki glikozile proteinlerin belirlenmesi amacıyla standart glikoz, g-HSA ve HbA1c çözeltileri hazırlanmış ve geliştirilen borat elektrotun bu yapıları akış enjeksiyon sistemde belirleme oranı değerlendirilmiştir. Nihai değerlendirme, başlangıçta akış

enjeksiyon sisteme beslenen $B_4O_7^{2-}$ -konsantrasyonunda meydana gelen azalmaya dayanarak yapılması hedeflenmiştir. Borat iyonlarının glikozile proteinlere bağlanması Bölüm 2.2’de anlatılmıştır.

5.2.1 Karbon Nano Tüp-Gümüş Borat (CNT-GB) Temelli Kompozit Borat Elektrotların Hazırlanması

Çalışmamızda öncelikle gümüş borat sentezlenmiştir. Gümüş boratı elde edebilmek için sodyum tetraborat ve gümüş nitrat tuzları kullanılarak hazırlanan 0,1 M sodyum tetraborat ve 0,1 M gümüş nitrat çözeltileri kullanıldı. Hazırlanan çözelti 1:1 hacimde olacak şekilde karıştırılarak gümüş boratın çöktürülmesi sağlandı. Karşım 20 dakika 5000 rpm’de santrifüj edildi. Çökelekler 90 °C’deki etüvde 4 saat kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelekler ile farklı kompozisyonlarda kompozit matrisler hazırlandı.

Diğer yandan karbon nano tüp-gümüş borat (CNT-GB) sentezi yapıldı. 0,1 g CNT alınarak 0,1 M $AgNO_3$ çözeltisi içerisinde karıştırılarak 1 saat süre ile 1,5 V’luk doğru akım uygulandı ve çözelti içerisinde bulunan Ag^+ iyonlarının CNT yüzeyinde Ag^0 ’a indirgenmesi sağlandı. Yüzeyinde indirgenmiş gümüş bulunan CNT, santrifüjlenerek çözeltiden ayrıldı. Süzülen CNT bu kez 0,1 M $Na_2B_4O_7$ çözeltisi içerisine konulup karıştırılarak 1 saat süre ile 1,5 V’luk doğru akım bu kez ters yönde uygulandı ve $B_4O_7^{2-}$ iyonları ile CNT yüzeyindeki gümüşün CNT yüzeyinde gümüş borat oluşturması sağlandı. CNT yüzeyinde gümüş borat oluşumu sağlandıktan sonra tekrar santrifüjlenerek süzüldü ve elde edilen CNT-GB etüvde kurutularak kompozit elektrot kompozisyonunda kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

Çalışmamızda yer alan borat elektrotların hazırlanması aşamasında 130’dan fazla farklı kompozisyon denenmiş ve optimum şartları sağlayan elektrot içeriği belirlenerek borat iyonuna olan seçicilikleri ve Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- gibi çözeltilere karşı seçicilikleri test edilmiştir. İlk çalışmalarda (1-39 serisi) serbest gümüş borat ve CNT bazlı kompozisyonlar denemiştir. Ancak tekrarlanabilir yanıtlar alınamadığından CNT yüzeyine gümüş borat tutturularak (CNT-GB) kompozisyonlar hazırlanmış ve potansiyometrik performansları değerlendirilmiştir. CNT-GB kompozit elektrotların tekrarlanabilir ve seçici yanıtlar

verdiği tespit edilmiştir. Tablo 6.1'e CNT-GB temelli kompozit kompozisyonlar verilmiştir.

Tekrarlanabilirliğin değerlendirilebilmesi için her kompozit bileşimi en az 3 adet olacak şekilde hazırlanmış ve iyi sonuç veren karışımlar 2-3 kez daha sentezlenerek tekrar test edilmiştir.

CNT-GB bazlı kompozit iyon seçici elektrot hazırlama prosedürü aşağıdaki gibidir: Kullanılacak materyallerin tümü yıkanır, (Gümüş borat ve karbon nano tüp sentezi) alkol-aseton-saf sudan geçirilerek etüvde kurutulduktan sonra kullanıma hazır hale getirilir. Belirtilen içeriklerdeki kimyasallar hassas terazide tartılarak havanda iyice ezilerek karıştırılır. Havanda karıştırılan malzeme saat camına alınır ve laminar kabin altında epoksi ve çözücüsü eklenerek kıvamlı bir hale gelene kadar spatül yardımıyla homojen bir karışım elde edilir. Elde edilen karışım spatül yardımıyla kateter borulara doldurulur. Katerer boru doldurulduktan sonra iki ucunu da tam olarak kapatacak şekilde vida-çivi gibi aparatlarla boru sıkıştırılır. İyice sıkıştırılan borularda kompozitlerin iyice kuruması sağlanır. Malzeme kuruma aşamasındayken borular zaman zaman sıkıştırılır. Ortalama kuruma süresi 3-4 haftadır. Şekil 5.2'de kompozitleri sıkıştırmada kullanılan mengene gösterilmiştir.



Şekil 5. 2 Kompozitlerin sıkıştırılması için kullanılan mengene

Kompozitlerin elektrot haline dönüştürülmesi: İyice kuruyan kompozitlerin bulunduğu kateter borulardan kesit alınır. Katı kontakt hazırlanarak bakır tele

kesilen kompozit tutturulur ve katı kontakt yüzeyi sıvı yapıştırıcı ile kaplanarak izole edilir ve yapıştırıcının iyice kuruması sağlanır.

İyice kuruyan elektrotlar 1×10^{-1} M borat çözeltisinde 1 gün doyurmaya bırakıldıktan sonra ölçüme hazır hale gelmektedir. Şekil 5.3'de kompozitlerin elektrot haline getirilmiş hali gösterilmiştir.



Şekil 5. 3 Kompozitlerin bakır tele katı kontakt ile tutturularak elektrot haline getirilmesi

5.2.2 Standart Glikoz, G-HSA ve HbA1c Çözeltilerinin Hazırlanması

Akış enjeksiyonda ölçüm alınmak üzere hazırlanan standart glikoz, g-HSA ve HbA1c çözeltileri aşağıdaki gibidir:

HbA1c saflaştırılmış olarak olarak (ticari) temin edilmiştir. (IRMM/Instute For Reference Materials And Measurument, BCR-405, Human blood haemolysate). 1ml ultra saf su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

G-HSA saflaştırılmış olarak olarak (ticari) temin edilmiştir (Sigma marka). 1 ml ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Glikozile albümin farklı prosedürlerle de hazırlanabilmektedir [98].

Glikoz çözeltisi (dekstroz monohidrat) 1×10^{-1} - 1×10^{-5} M arası 10 kat fark olacak şekilde 5 farklı derişimde hazırlanmıştır.

5.2.3 Kolon Dolgu Maddesinin Hazırlanması

Akış enjeksiyon sistemde glikoz, g-HSA ve HbA1c'yi ayırmada kullanılacak olan ayırım kolonu dolgu maddesi grafit oksit-aminofenilboronik asit (GO-APBA) temelli hazırlanmıştır.

100 mg grafit oksit 40 ml ultra saf su içinde çözüldü. Homojen karışması için 5 dk ultrasonikasyon işlemi yapıldı. 0.5 mL karbodiimid/n-hidroksisüksinamid (1:1 w/w) eklendi. 1 saat karıştırıldı. 80 mg APBA eklendi. Bir gece karışmaya bırakıldı. 200 mg L-askorbik asit eklenerek su banyosunda ve 37 °C'de 24 saat bekletildi. 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra 25 °C'de 24 saat kurumaya bırakıldı. Kolon dolgusu yerleştirilecek kısım 0.1 mol/l'lik hidroklorik asit çözeltisinde 1 gün bekletildi. Sonra saf sudan geçirilerek temizlendi. Yaklaşık 50 mg GO-APBA karışımı bu kısma dolduruldu. Malzemenin kaçmaması için iki uç kısmına pamuk tıkaç yerleştirildi. Kullanılmadan önce kolon dolgusu, metil alkol ve saf sudan geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi ve kolona dolduruldu (50mg).

5.3 Çalışma Yöntemi

Bu çalışmada karbon nano tüp-gümüş borat (CNT-GB) kompozit iyon seçici elektrot geliştirilerek elektrotların durgun potansiyometrik performans özellikleri test edildi. CNT-GB kompozit elektrotların akış enjeksiyon analiz sistemlerinde sergilediği potansiyometrik davranışlar test edildi. Hazırlanan kompozit elektrotlar ile ölçüm alınmadan önce elektrotların yüzeylerinden çok ince bir kesit alındı ve yüzeylerin aktif hale getirilmesi sağlandı.

Durgun ortam ölçümleri, oda sıcaklığında CNT-GB temelli kompozit borat elektrotların standart çözeltiler içerisine doğrudan daldırılması ile yapıldı.

Kompozit borat seçici elektrodun akış enjeksiyon analiz (FIA) sisteminde dedektör olarak kullanılabilirliği araştırıldı. Bu amaçla, mikro hacime sahip akış hücresi hazırlandı. Hareketli ortam ölçümleri tasarladığımız akış hücresine CNT-GB temelli

kompozit borat elektrotun ve Ag/AgCl referans elektrotun yerleştirilmesi ve hareketli faz olarak 5×10^{-4} M borat çözeltisinin kullanılmasıyla yapıldı.

FIA sisteminin optimizasyonu için hareketli faz ve akış hızı parametreleri test edilerek en uygun akış parametreleri belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda glikoz, g-HSA ve HbA1c standart çözeltileri akış enjeksiyon sisteme farklı konsantrasyonlarda enjekte edilerek potansiyometrik cevapları tespit edildi. Hazırlanan ayırma kolonu enjeksiyon ve dedektör bölmesi arasına yerleştirilerek standart çözelti karışımı sisteme enjekte edilmiş ve eş zamanlı HbA1c, g-HSA ve glikoz düzeyi analiz edilmeye çalışılmıştır. Akabinde standart ilavesi edilmiş serumlarla ölçümler alınarak sonuçlar kıyaslanmıştır. Başlangıçta sisteme beslenen borat konsantrasyonundaki azalma değerlendirilerek glikozun, g-HSA'nın ve HbA1c'nin borata bağlanma miktarı tespit edilmesi hedeflenmiştir.

6.1 Durgun Ortam Çalışmaları

6.1.1 CNT-GB Elektrotlar İle Durgun Ortam Çalışmaları

Tablo 6.1’de çalışma için hazırlanan CNT-GB kompozit elektrot kompozisyonları verilmiştir. Öncesinde serbest halde gümüş borat ve karbon nano tüp bulunan seriler (1-39 serisi) hazırlanmıştır ancak istenilen düzeyde potansiyometrik performans alınamadığı için CNT-GB sentezlenerek kompozisyonlar oluşturulmuştur.

Tablo 6. 1 CNT-GB kompozit elektrot kompozisyonları

Kompozisyon	CNT (g)	CNT- Ag ₃ BO ₃	Ag ₂ S	Cu ₂ S	Epoksi
40*	0,1	0,01	0,08	0,01	0,8
41	0,02	0,09	0,08	0,01	0,8
42	0,04	0,07	0,08	0,01	0,8
43	0,04	0,1	0,08	0,01	0,8
44	0,08	0,1	0,08	0,01	0,8
45	0,1	0,1	0,08	0,01	0,6
46	0,1	0,15	0,08	0,01	0,6
47	0,1	0,15	0,08	0,01	0,8
48	0,15	0,15	0,08	0,01	0,6

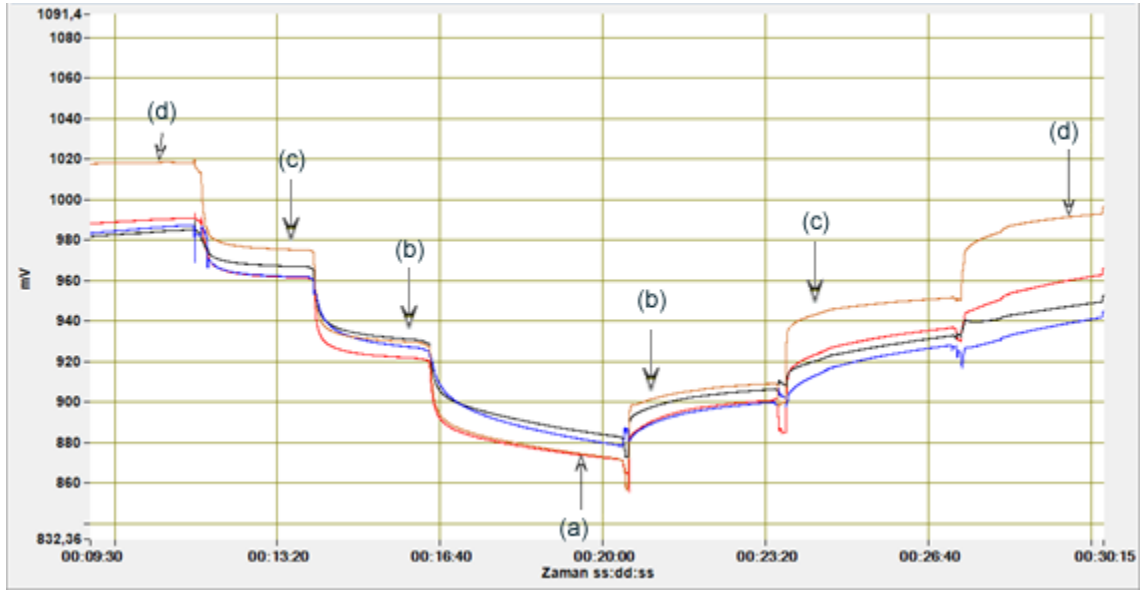
49	0,15	0,05	0,08	0,01	0,6
50	-	0,2	-	-	0,4
51	0,1	-	0,08	0,01	0,1
52	0,1	-	0,08	0,01	0,2
53	0,1	-	0,08	0,01	0,3
54	0,1	-	0,08	0,01	0,4
55	0,11	-	0,08	0,01	0,1
56	0,11	-	0,08	0,01	0,2
57	0,11	-	0,08	0,01	0,3
58	0,11	0,04	0,08	0,01	0,22
59	0,11	0,02	0,08	0,01	0,22
60	0,11	0,04	0,08	0,01	0,22
61	0,11	0,06	0,08	0,01	0,22
62	0,11	0,08	0,08	0,01	0,22
63	0,15	0,02	0,08	0,01	0,22
64	0,01	0,1	0,08	0,01	0,22
65	0,01	0,1	0,08	0,01	0,8
66	0,11	-	0,08	0,01	0,2
67	0,1	0,01	0,08	0,01	0,4
81*	0,01	0,01	0,08	0,01	0,6

84*	0,1	0,01	0,08	0,03	0,3
90*	0,1	0,01	0,08	0,03	0,2
102*	0,1	0,01	0,08	0,03	0,2
103*	0,1	0,01	0,08	0,03	0,1

*Daha iyi sonuç veren karışımlar: Durgun fazdaki $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M standart sodyum tetraborat çözeltisine karşı sergiledikleri tekrarlı potansiyometrik davranışlar baz alınarak daha iyi sonuç veren karışımlara karar verilmiştir.

Tablo 6.1’de gösterilen farklı kompozisyonlardaki her bir karışım katater borular içerisine doldurularak mengenede sıkıştırıldı ve oda sıcaklığında ortalama üç hafta kuruması sağlandı. Kuruyan kompozitlerden uygun uzunlukta kesitler alınarak akış hücresine uygun boyuttaki plastik boru içerisine yerleştirildi. Borunun uç kısmı halka şeklinde sıvı yapıştırıcı ile kaplanarak içine sıvı kaçıışı engellendi. Ardından bir bakır telin ucuna katı kontakt kullanılarak yapıştırıldı. Katı kontakt içeriği % 50 grafit, % 35 epoksi, % 15 çözücü şeklinde kullanılmıştır. Yapıştırılan kısımlarda kalan açıklıklar ve katı kontakt materyali pateks tarzı bir yapıştırıcı ile izole edilerek CNT-GB kompozit elektrotların hazırlaması tamamlandı. Elektrotlar 1 gece $1,0 \times 10^{-1}$ M standart sodyum tetraborat çözeltisi içerisinde doyurularak potansiyometrik ölçüme hazır hale getirildi.

CNT-GB kompozit elektrotların $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M arasında standart sodyum tetraborat çözeltisi içerisinde tetraborat ($B_4O_7^{2-}$) iyonlarına karşı sergilediği potansiyometrik davranışlar incelendi. Yaptığımız ölçümler sonunda en iyi potansiyometrik performansı sergileyen kompozisyonun 102-103 serisi olduğuna karar verildi. 102-103 nolu elektrotun borat iyonlarına karşı sergilediği potansiyometrik davranış Şekil 6.1’de görülmektedir.



Şekil 6. 1 102 Nolu kompozisyon ile hazırlanan elektrot serisinin $B_4O_7^{2-}$ iyonlarına karşı sergilediği potansiyometrik yanıt

(a): $1,0 \times 10^{-1}$ M $B_4O_7^{2-}$, (b): $1,0 \times 10^{-2}$ M $B_4O_7^{2-}$, (c): $1,0 \times 10^{-3}$ M $B_4O_7^{2-}$, (d): $1,0 \times 10^{-4}$ M $B_4O_7^{2-}$

$1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M arasında katyon türü sabit tutulmuş (sodyum tuzları kullanılarak hazırlanan) standart anyon çözeltilerine karşı CNT-GB kompozit elektrotların sergilediği potansiyometrik davranışlar, elektrotların standart anyon çözeltileri içerisinde ($1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M arasında) direkt olarak daldırılmasıyla test edildi. Bir çözeltiden diğer bir çözeltiye geçiş sırasında elektrotların ultra saf su ile iyice yıkanmasına dikkat edildi.

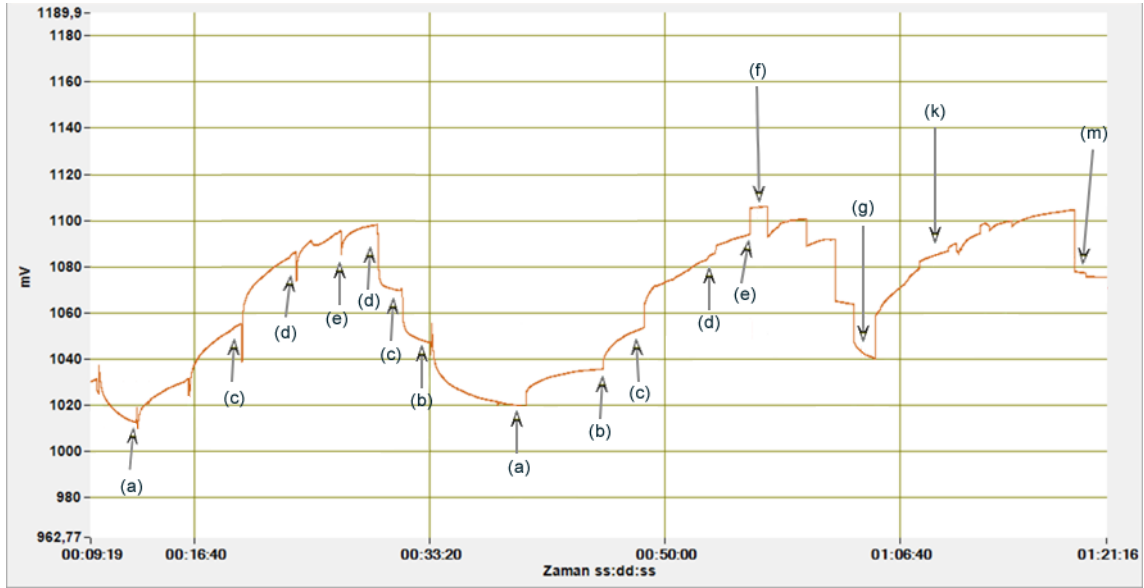
6.1.2 CNT-GB Kompozit Elektrotların Potansiyometrik Performans

Özellikleri

Bu bölümde hazırlanan kompozit borat seçici elektrotların seçicilik katsayısı, tayin limiti, çalışma ömrü, cevap zamanı, tekrarlanabilirlik, pH çalışma aralığı ve elektrodun tekrarlanabilirlik davranışları incelenmiştir.

- **CNT-GB Kompozit Elektrotların Seçicilik Katsayısı**

Standart anyon çözeltilerine karşı geliştirilen CNT-GB elektrotun sergilediği potansiyometrik davranışlar Şekil 6.2 ve Şekil 6.3'de verilmiştir.

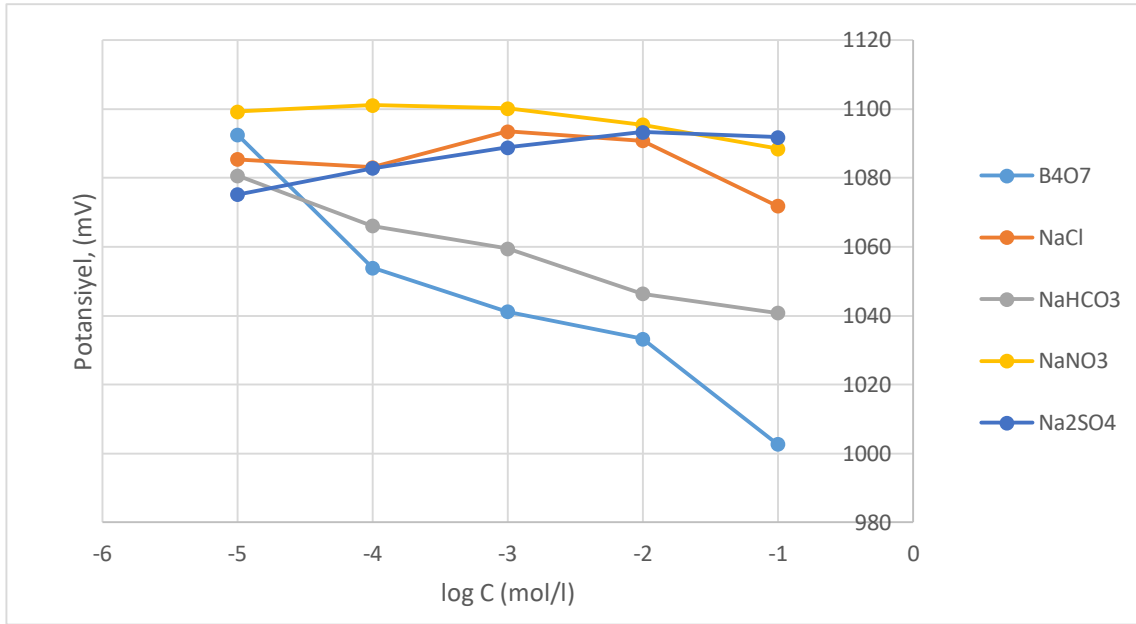


Şekil 6. 2 102 Nolu elektrotun seçicilik katsayısı belirlenirken alınan potansiyometrik ölçüm örneği

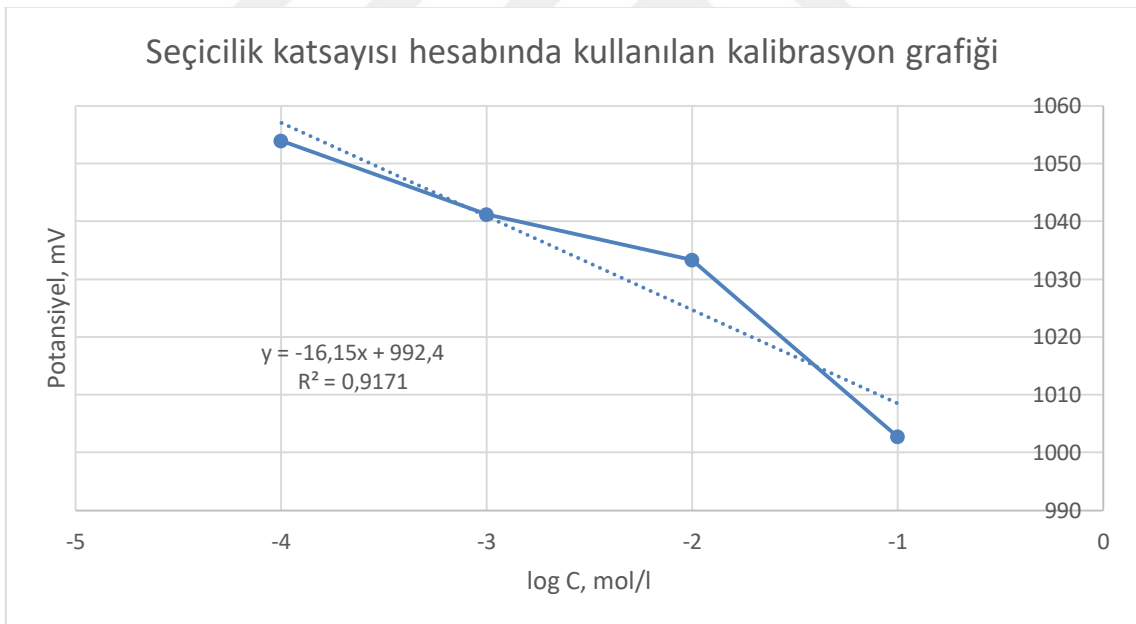
(a): $1,0 \times 10^{-1}$ M $B_4O_7^{2-}$, (b): $1,0 \times 10^{-2}$ M $B_4O_7^{2-}$, (c): $1,0 \times 10^{-3}$ M $B_4O_7^{2-}$, (d): $1,0 \times 10^{-4}$ M $B_4O_7^{2-}$, (e): $1,0 \times 10^{-5}$ M $B_4O_7^{2-}$, (f): $1,0 \times 10^{-5}$ M HCO_3^- , (g): $1,0 \times 10^{-1}$ M HCO_3^- , (k): $1,0 \times 10^{-5}$ M Cl^- , (m): $1,0 \times 10^{-1}$ M Cl^-

Şekil 6.3’de borat seçici elektrotun standart anyon çözeltilerine karşı sergilediği potansiyometrik cevap grafiği yer almaktadır.

Geliştirdiğimiz elektrotun borat iyonlarına karşı seçici bir davranış sergilediği görüldü. Elektrotların seçici davranışını daha detaylı anlayabilmek için seçicilik katsayıları hesaplandı. Bunun için öncelikle $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ M standart $B_4O_7^{2-}$ çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler ile CNT-GB kompozit elektrotların $B_4O_7^{2-}$ çözeltilerine karşı sergilediği potansiyel değişimleri incelendi. Elde edilen veriler ile kalibrasyon grafiği çizildi ve bir doğru denklemi elde edildi. Daha sonra yine aynı elektrotların farklı standart anyon çözeltilerinin $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M arasında değişen konsantrasyonlardaki potansiyel değişimleri ölçülerek kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Elde edilen kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi yardımıyla CNT-GB kompozit elektrotların seçicilik katsayıları hesaplandı. Seçicilik katsayılarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği Şekil 6.4’de verilmiştir.



Şekil 6. 3 Borat seçici elektrotun standart anyon çözeltilerine karşı sergilediği potansiyometrik cevaplar



Şekil 6. 4 Seçicilik katsayısı hesabında kullanılan kalibrasyon grafiği

Tablo 6.3'de verilen potansiyel değerler ile ayrı çözelti metoduna göre seçicilik katsayıları hesaplanmıştır. Tüm iyonların ayrı çözelti metoduna göre yaptıkları girişim değerleri Tablo 6.2'de verilmiştir.

Tablo 6. 2 CNT-GB kompozit elektrotların farklı anyonların değişen derişimlerine karşı sergilediğı potansiyel değerleri

Çözelti	$1,0 \times 10^{-1}$ M	$1,0 \times 10^{-2}$ M	$1,0 \times 10^{-3}$ M	$1,0 \times 10^{-4}$ M
B ₄ O ₇	1002,7	1033,3	1041,2	1053,9
NaCl	1071,9	1090,8	1093,5	1083,1
NaHCO ₃	1040,8	1046,4	1059,5	1066,1
NaNO ₃	1088,5	1095,5	1100,2	1101,1
Na ₂ SO ₄	1091,8	1093,3	1088,9	1082,8

İyon seçici elektrotlardaki log a ve E arasındaki ilişki ana iyon için elde edilmektedir. Eşit iyon aktivitesi olduğu durumlarda aşağıdaki eşitlik kullanılarak seçicilik katsayısı hesaplanır. Seçicilik katsayısı ayrı çözelti metoduna göre aşağıdaki denklik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Log } (K_{i,j}) = (E_j - E_i) zF / 2,303 RT \quad (6.1)$$

R=Gaz Sabiti: 8.314 J/mol K

F=Faraday Sabiti: 96.500 Coulomb/mol

T=Mutlak Sıcaklık: 298 K

z: ana iyon yükü: -2 (B₄O₇²⁻)

Tablo 6. 3 Borat seçici elektrotların seçicilik katsayıları (Ayrı çözelti metodu)

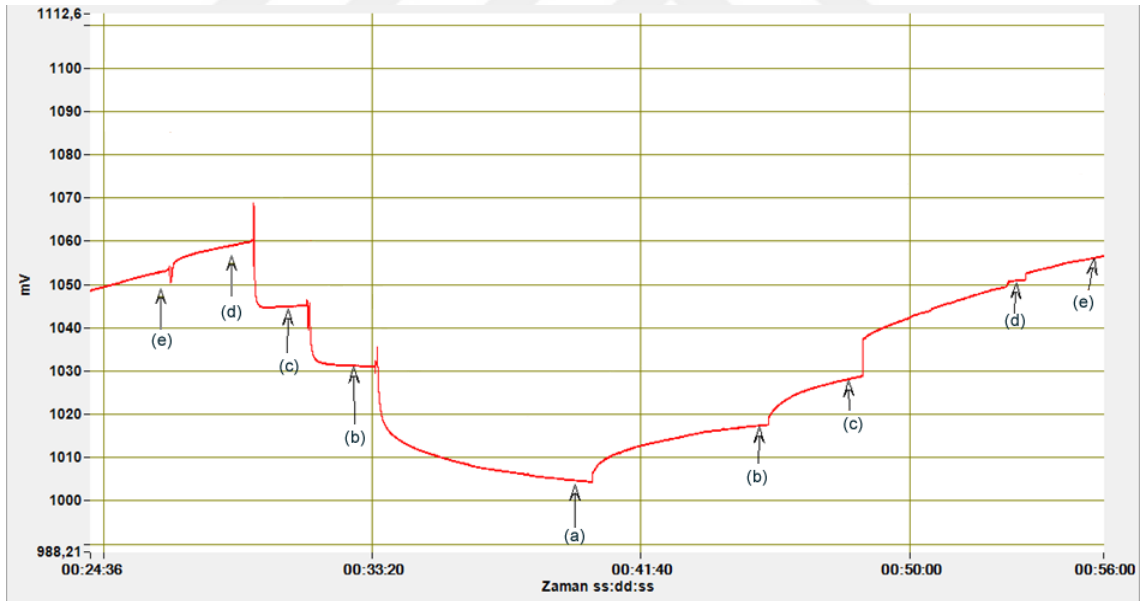
Anyonlar	(K _{i,j})	-log (K _{i,j})
Cl	-0,00233	2,63
SO ₄	-0,00297	2,52

HCO ₃	-0,00125	2,90
NO ₃	-0.00295	2,52

Bu hesaplamalar sonunda CNT-GB kompozit elektrotlar ile yapılan ölçümlerde borat-seçici elektrodun borat iyonu yanında, nitrat, klorat, sülfat ve bikarbonat iyonlarına karşı seçici davranmadığı gözlemlendi.

- **CNT-GB Kompozit Elektrotların Tayin limiti**

İyon seçici elektrotun membran ara fazında ölçülebilir bir potansiyel farkı meydana getiren en düşük iyon derişimi tayin limitini vermektedir. Genel olarak iyon-seçici elektrotlar için tayin limiti 1×10^{-4} ile 1×10^{-5} mol/l aralığındadır. Şekil 6.5’de görüldüğü üzere geliştirilen 102 nolu kompozit borat seçici elektrotların tayin limiti 1×10^{-4} M olarak belirlenmiştir.

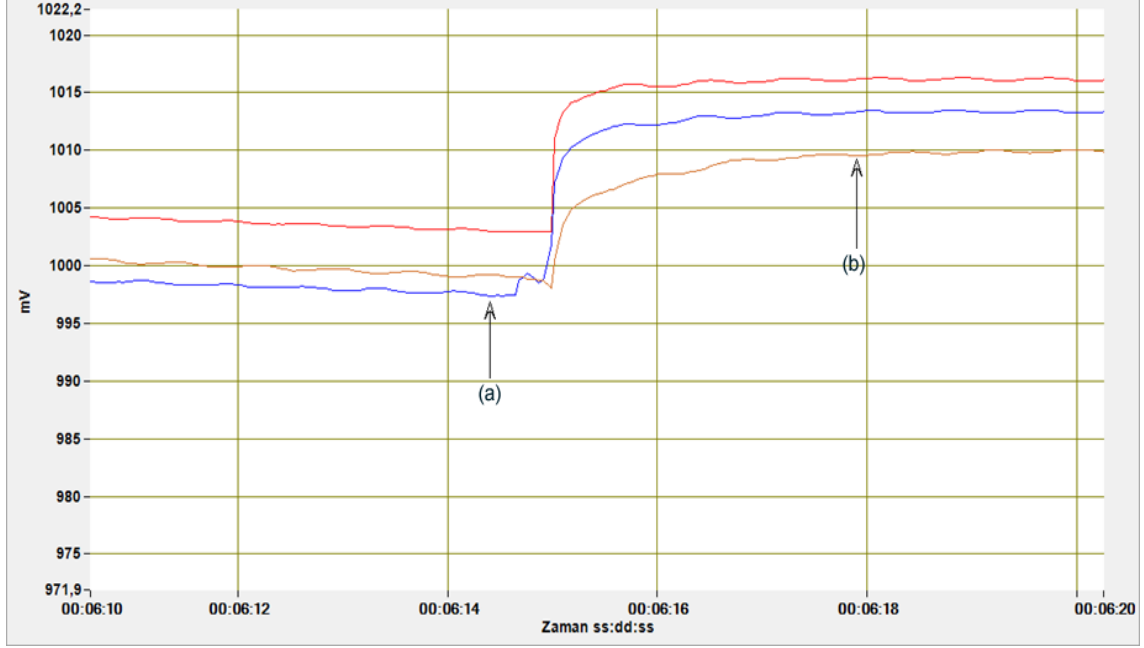


Şekil 6. 5 Geliştirilen 102 nolu kompozit borat seçici elektrotların tayin limiti

(a): $1,0 \times 10^{-1}$ M B₄O₇²⁻, (b): $1,0 \times 10^{-2}$ M B₄O₇²⁻, (c): $1,0 \times 10^{-3}$ B₄O₇²⁻, (d): $1,0 \times 10^{-4}$ B₄O₇²⁻
(e): $1,0 \times 10^{-5}$ B₄O₇²⁻

- **CNT-GB Kompozit Elektrotların Cevap zamanı**

IUPAC tanımına göre cevap zamanı; dedektör çıktısının başlangıç değerinin belirli yüzdelere (örneğin % 90 ila % 10) arasında değişmesi için gereken zamandır[99]. Geliştirilen kompozit borat seçici elektrotların cevap zamanı konsantrasyona bağlı olarak 4-20 saniye aralığında değişim göstermektedir. Şekil 6.6'da 88 nolu elektrotun cevap zamanı (4 saniye) gösterilmektedir.

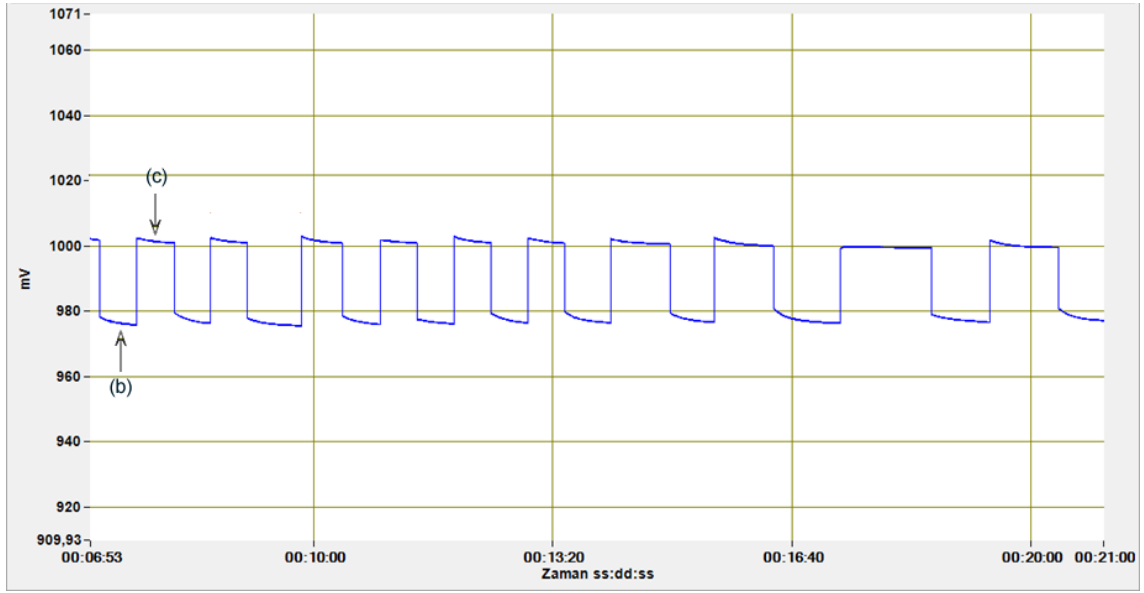


Şekil 6. 6 88 nolu elektrotun cevap zamanını gösteren grafik.

(a): $1,0 \times 10^{-1} \text{ M B}_4\text{O}_7^{2-}$, (b): $1,0 \times 10^{-2} \text{ M B}_4\text{O}_7^{2-}$

- **CNT-GB Kompozit Elektrotların Tekrarlanabilirlik Testi**

Tekrarlanabilirlik; farklı derişimlerdeki çözeltilerde elektrot potansiyelinin ölçülmesi ve bu işlemin tekrarlanması sonucu elde edilen değerlerin standart sapmasıdır. Bu sonuç analizin güvenilirliği konusunda önemli bir parametredir. Geliştirdiğimiz borat elektrotun tekrarlanabilirlik testi $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ve $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ borat çözeltisi ile aşağıdaki şekilde belirlenmiştir. Şekil 6.7'de tekrarlanabilirlik testi verilmiştir.



Şekil 6. 7 102 Nolu elektrotun tekrarlanabilirlik testi

(b): $1,0 \times 10^{-2}$ M $B_4O_7^{2-}$, (c): $1,0 \times 10^{-3}$ M $B_4O_7^{2-}$

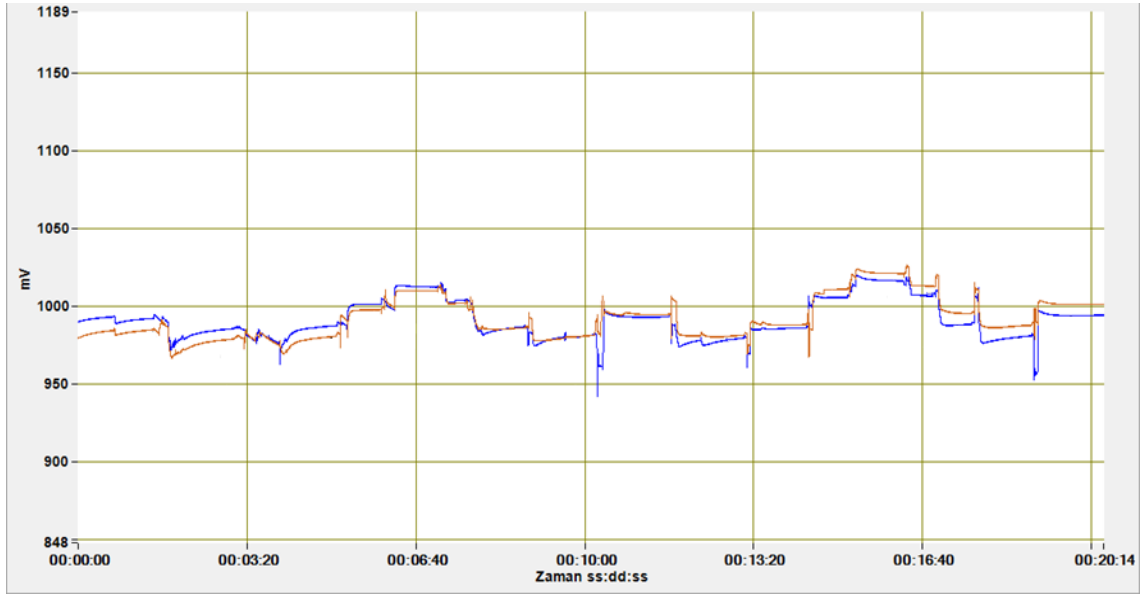
Geliştirdiğimiz elektrotların 1×10^{-2} M ve 1×10^{-3} M borat çözeltisi ile yapılan tekrarlanabilirlik performansı istenilen düzeyde olduğu görülmektedir.

- **CNT-GB Kompozit Elektrotların Kullanım Ömrü**

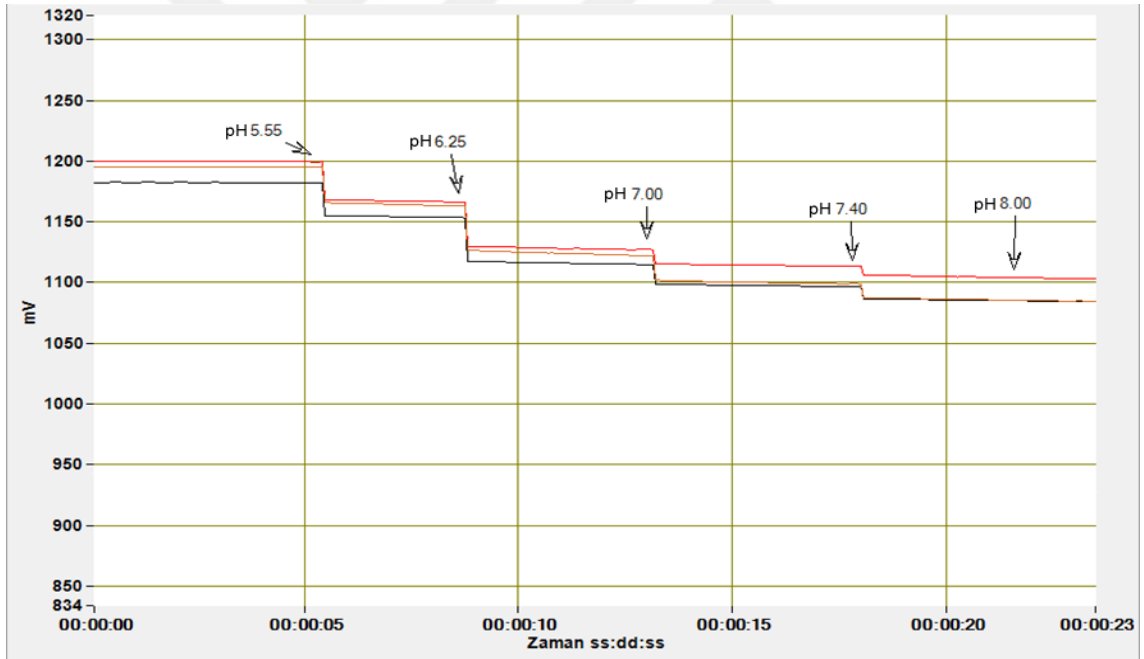
Kullanım ömrünü belirlemek için 102 nolu elektrot baz alınmıştır. İlk ölçüm Mayıs 2018’de, son ölçüm Ekim 2018’de yapılmıştır. Ekim ayında alınan ölçüm Şekil 6.8’deki gibidir. Kullanım ömrü 102 nolu elektrot için 5 ay olarak belirlenmiştir. Genel olarak elektrotların kullanım ömrünün 5-8 ay olduğu görülmüştür.

- **CNT-GB Kompozit Elektrotların pH Çalışma Aralığı:**

Hazırladığımız çözeltilerin pH değerleri Microcomputer pH/ Conductivity /Temp Meter 6307 marka pH ölçüm cihazı ile yapılmıştır. Öncelikle sodyum fosfat çözeltisi pH’sı 7.4 olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için 68.4 ml Na_2HPO_4 ve 31.6 ml NaH_2PO_4 çözeltisi kullanılmıştır. 0,1 M NaOH ve 0,01 M HCl eklenerek pH bazik (pH: 8.72) ve asidik (pH: 5.96) olacak şekilde ayarlanmıştır. Borat seçici elektrotun pH çalışma aralığı pH 7-8 olarak belirlenmiştir. Kan pH değeri 7,4 olduğundan CNT-GB kompozit elektrotlar kan numunesi ile çalışmak için uygun bulunmuştur. Şekil 6.9’da pH çalışma aralığı tayini yer almaktadır.



Şekil 6. 8 5 ay sonunda 102 nolu elektrotların potansiyometrik performansları

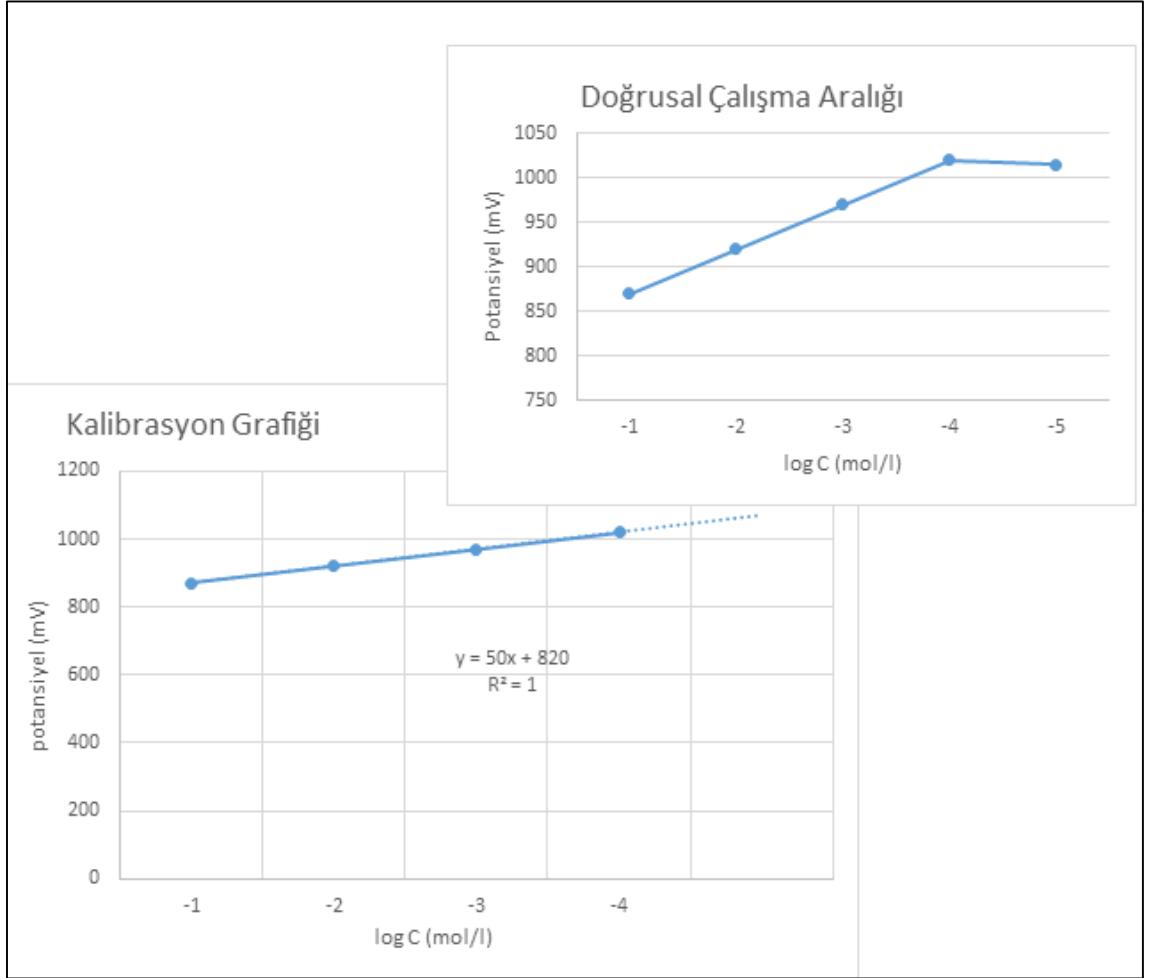


Şekil 6. 9 102 nolu CNT-GB elektrotların pH çalışma aralığı

- **CNT-GB Kompozit Elektrotların Doğrusal Çalışma Aralığı**

CNT-GB kompozit elektrotları kullanarak yaptığımız potansiyometrik ölçümler sonucunda elektrotların $1,0 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-1}$ M arasında standart $B_4O_7^{2-}$ iyonlarına

karşı doğrusal cevap sergilediği gözlemlendi. Elektrotların doğrusal çalışma aralığında her 10 katlık konsantrasyon değişiminde yaklaşık olarak 20 - 35 mV potansiyel fark oluşturduğu gözlemlendi. Şekil 6.10'da geliştirilen elektrotların doğrusal çalışma aralığı ve kalibrasyon grafiği yer almaktadır. Grafikten doğrusal çalışma aralığının 1×10^{-1} - 1×10^{-4} M aralığında olduğu gözlenmektedir.



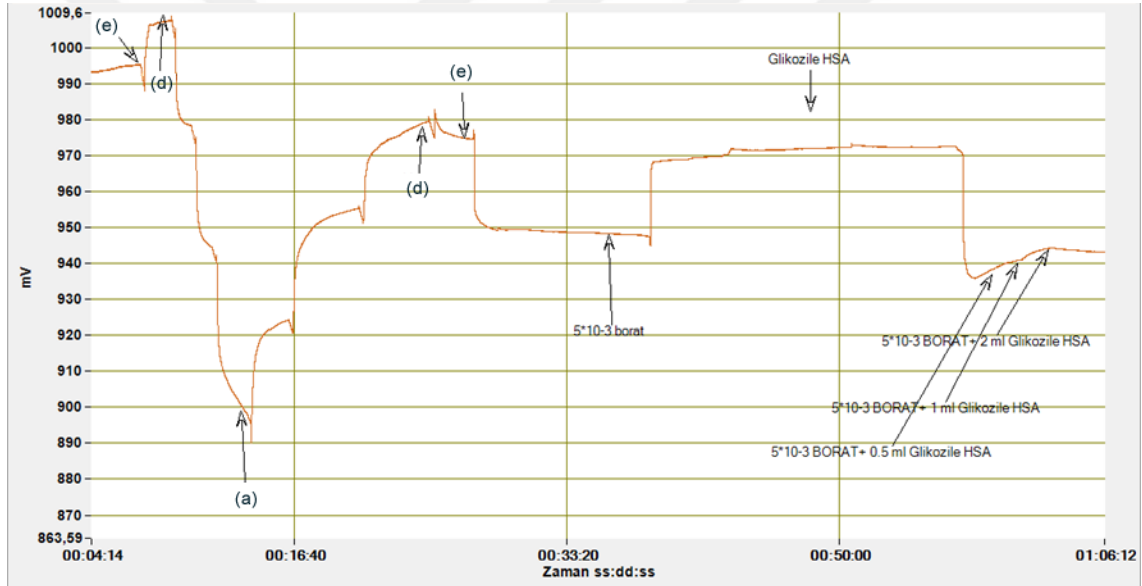
Şekil 6. 10 CNT-GB elektrotların durgun fazda doğrusal çalışma aralığı ve kalibrasyon grafiği

Aynı şartlar altında işlemler tekrarlandığında da benzer potansiyel ölçümler alınmıştır. Bu nedenle geliştirdiğimiz elektrotun tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiğine karar verilmiş ve akış enjeksiyon sistemde dedektör olarak kullanılmaya uygun bulunmuştur.

6.1.3 Durgun Ortamda Standart Çözeltilere Karşı Alınan Potansiyometrik Yanıtlar

Bu bölümde durgun ortamda glikoz, g-HSA ve HbA1c'ye karşı alınan potansiyometrik yanıtlar değerlendirilmiştir. Ticari olarak temin edilen saflaştırılmış g-HSA ve HbA1c 1ml ultra saf su ile seyreltilip 24 saat boyunca 4 °C'de bekletildikten sonra ölçümlerde kullanılmışlardır.

Şekil 6.11'de CNT-GB kompozit elektrotların 1×10^{-5} - 1×10^{-1} M borata verdiği yanıt test edildikten sonra, 3 ml 5×10^{-3} M borat çözeltisine farklı hacimlerde (sırasıyla 0,5 ml, 1ml, 1ml) 1×10^{-2} M g-HSA eklenerek elde edilen potansiyel değişimi görülmektedir. Beklenildiği üzere 5×10^{-3} M borat çözeltisine g-HSA eklendikçe pikler pozitif yönde konsantrasyonla doğru orantılı şekilde değişmektedir.

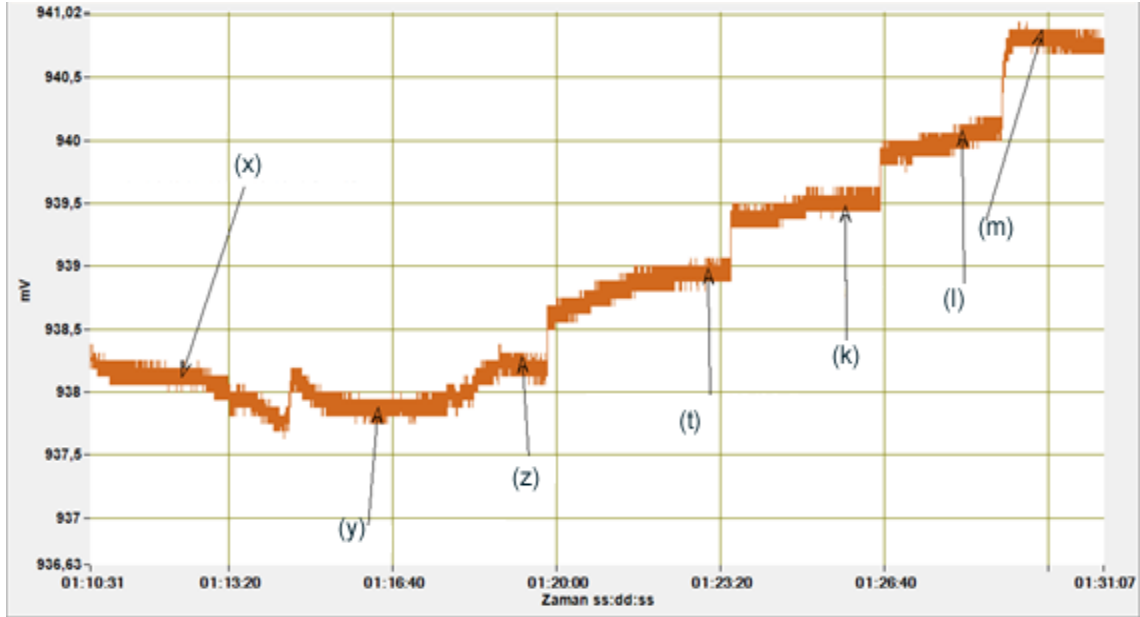


Şekil 6. 11 Durgun ortamda borat çözeltisine g-HSA eklenerek alınan potansiyometrik yanıt

(a): $1,0 \times 10^{-1}$ M $B_4O_7^{2-}$, (d): $1,0 \times 10^{-4}$ $B_4O_7^{2-}$ (e): $1,0 \times 10^{-5}$ $B_4O_7^{2-}$

Şekil 6.12'de durgun ortamda 3 ml 5×10^{-3} M borat çözeltisine glikoz eklenerek alınan potansiyometrik yanıt görülmektedir. Beklenildiği üzere 5×10^{-3} M borat çözeltisine ardarda 1'er ml 1×10^{-2} M glikoz çözeltisi eklendikçe pikler pozitif yönde

tutarlı bir şekilde değişmektedir. Bu durum geliştirilen CNT-GB kompozit elektrotların glikoza karşı seçici çalıştığını göstermektedir.



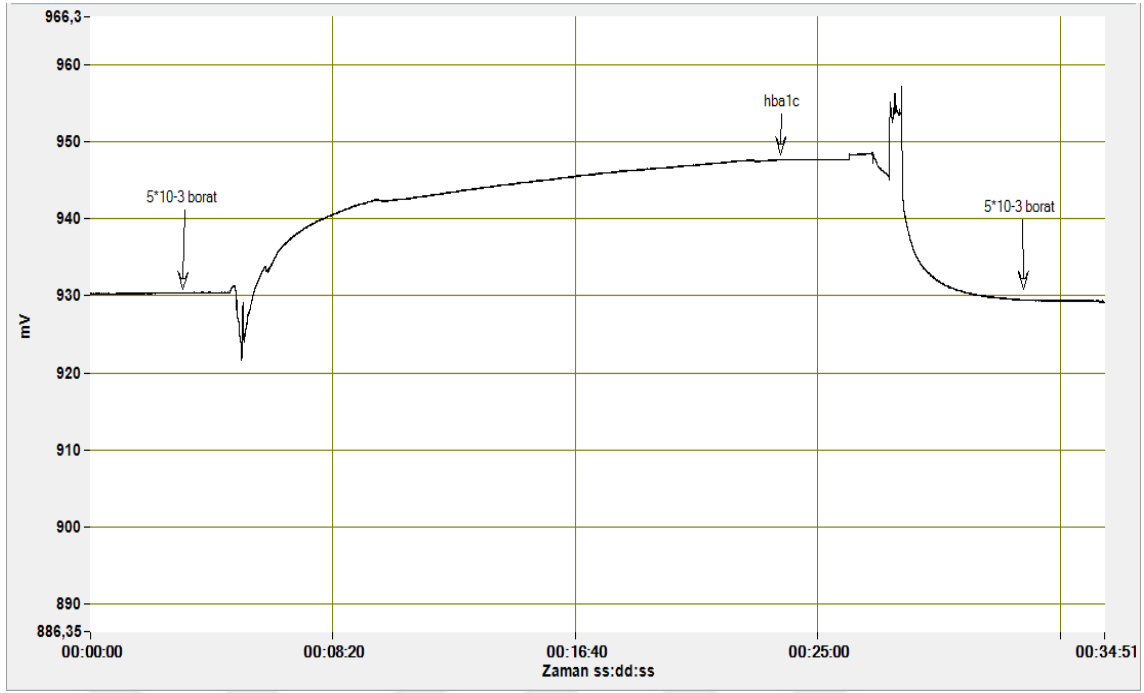
Şekil 6. 12 Durgun ortamda 5×10^{-3} M borat çözeltisine 1×10^{-2} glikoz eklenerek alınan potansiyometrik yanıt

(x): 5×10^{-3} M borat + 900 μ l 1×10^{-2} M glikoz, (y): 5×10^{-3} M borat + 1100 μ l 1×10^{-2} M glikoz, (z): 5×10^{-3} M borat + 2 ml 1×10^{-2} M glikoz, (t): 5×10^{-3} M borat + 3 ml 1×10^{-2} M glikoz, (k): 5×10^{-3} M borat + 4 ml 1×10^{-2} M glikoz, (l): 5×10^{-3} M borat + 5 ml 1×10^{-2} M glikoz, (m): 5×10^{-3} M borat + 6 ml 1×10^{-2} M glikoz

Şekil 6.13’de durgun ortamda öncelikle 5×10^{-3} M borat okunduktan sonra 5×10^{-3} M borat çözeltisine 1er ml 1×10^{-1} M HbA1c eklenerek alınan potansiyometrik yanıt beklenildiği üzere pozitif yönde değişen pik şeklinde olmuştur. Ardından CNT-GB elektrot tekrar 5×10^{-3} M borat çözeltisine daldırıldığında alınan potansiyometrik yanıt beklenildiği üzere negatif yönde olmuştur.

6.2 Hareketli Ortam Çalışmaları

Hareketli ortam çalışmaları tasarladığımız akış enjeksiyon analiz (FIA) sistem üzerinden yapılmıştır.



Şekil 6. 13 Durgun ortamda HbA1c'ye karşı alınan potansiyometrik yanıt

6.2.1 CNT-GB Kompozit Elektrotların Hareketli Ortam Çalışmaları

CNT-GB kompozit elektrotların akış enjeksiyon analiz (FIA) sistemlerinde dedektör olarak kullanılabilmesi için mini akış hücreleri tasarlandı. Hazırlanan bu akış hücreleri Şekil 6.14'de görülmektedir. Şekil 6.14'de hazırlanan akış hücreleri ile sızdırma probleminden dolayı verimli bir ölçüm elde edilemedi. Bu hücrelerle yapılan sızdırmalık testi Şekil 6.15'de görülmektedir. Bu nedenle ayrı bir enjeksiyon bölmesi ve dedektör bölmesi olacak şekilde 2 parçalı bir akış hücresi tasarlanmıştır.

Şekil 6.16 ve Şekil 6.17'deki gibi farklı bir akış hücresi tasarımı yapılarak sızdırma sorunu giderildi ve akış enjeksiyon sistemde tetraborat iyonları tayini yapıldı.

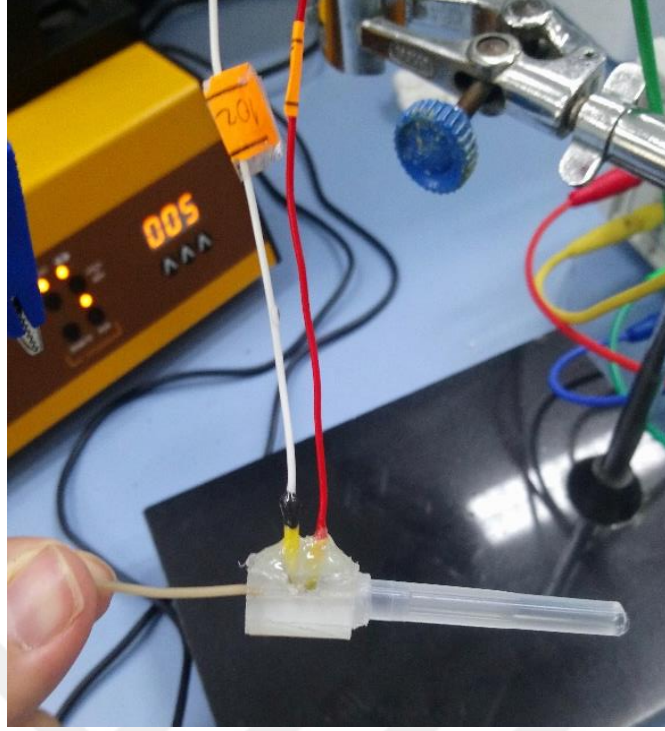
Öncelikle FIA sisteminin optimizasyonu için hareketli faz konsantrasyonu ve akış hızı parametreleri test edilerek optimum akış parametreleri belirlendi. Şekil 6.18'de kullanılan akış enjeksiyon sistem gösterilmiştir.



Şekil 6. 14 Akış enjeksiyon için tasarlanan çeşitli akış hücreleri



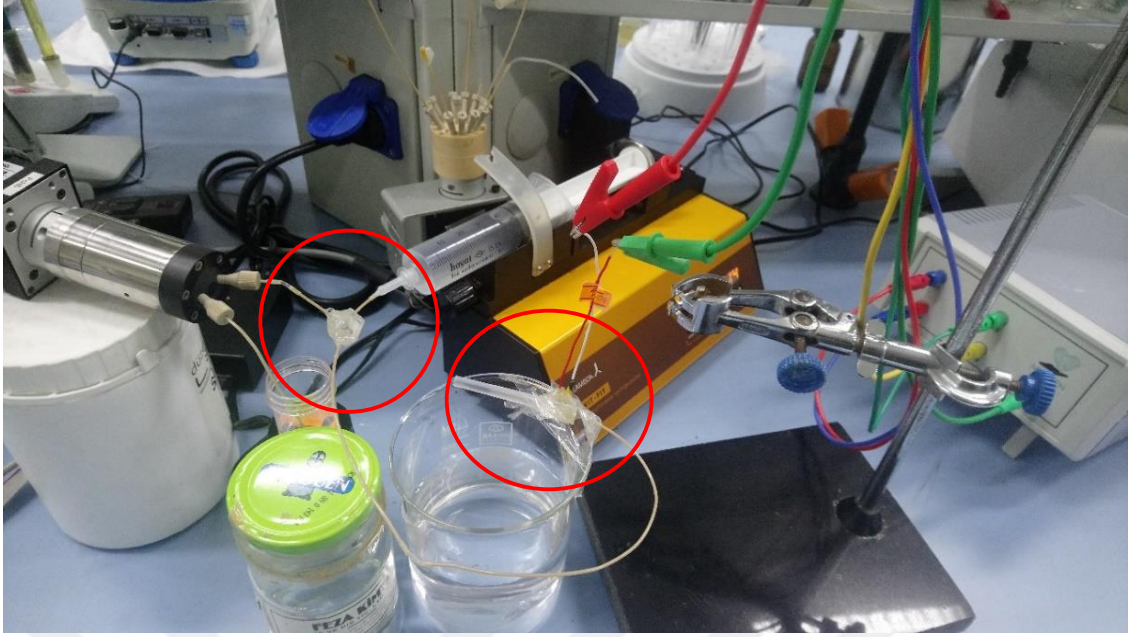
Şekil 6. 15 Akış hücrelerinin sızdırmazlık testi



Şekil 6. 16 Akış Enjeksiyon sistemde kullanılan akış hücresinin dedektör bölgesi



Şekil 6. 17 Akış hücresinin valfe ve hareketli faza bağlı numune enjeksiyon bölgesi

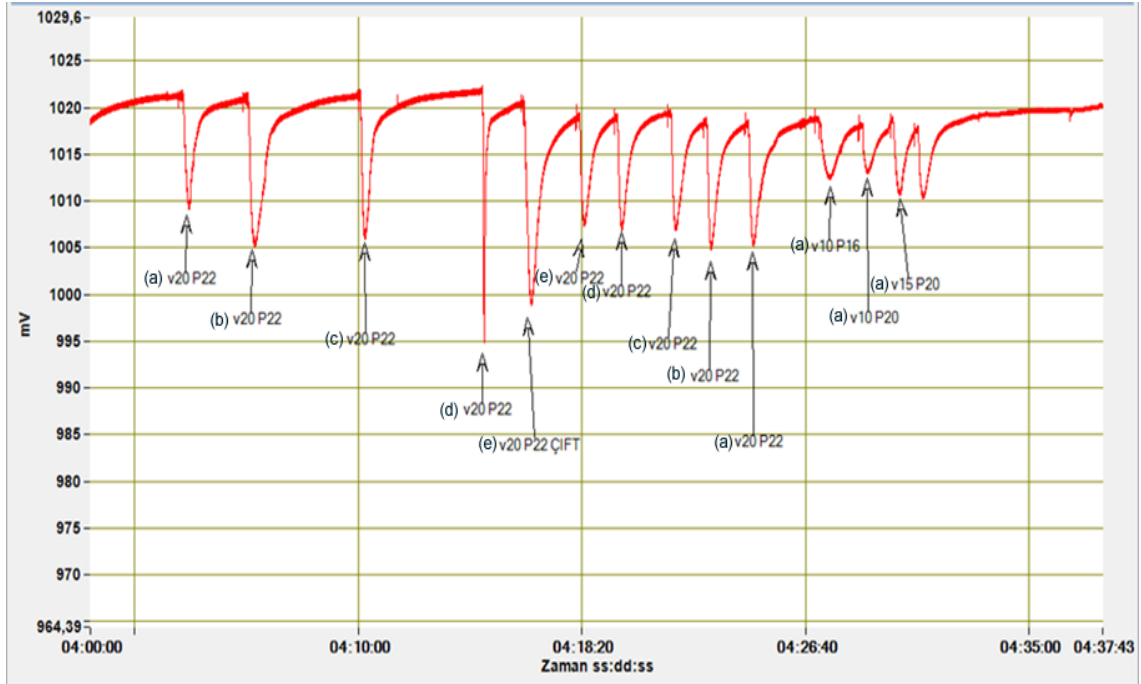


Şekil 6. 18 Çalışmada kullanılan akış enjeksiyon analiz sistemi 2 parçalı akış hücresi

Tasarlanan akış enjeksiyon analiz sistemde birçok akış hızı ve enjeksiyon hacmi denenmiştir. Bu şekilde ortaya çıkarılan en uygun akış hızı ve enjeksiyon hacmi belirlenmesi sırasında alınan bir ölçüm örneği Şekil 6.19'da yer almaktadır. Optimizasyon çalışması sırasında öncelikle enjekte edilen 1×10^{-1} - 1×10^{-3} M borat çözeltileri hacmi 15 μ l olacak şekilde sabit tutulup, hareketli faz (5×10^{-5} M borat çözeltisi) akış hızı 2-30 μ l/s aralığında değiştirilmiştir. Akabinde hareketli faz akış hızı 14 μ l/s olacak şekilde sabitlenerek 1×10^{-1} M- 1×10^{-4} M borat çözeltileri enjeksiyon hacmi 5-100 μ l aralığında değiştirilerek optimizasyon çalışması yapılmıştır.

Çok sayıda enjeksiyon hacmi ve akış hızları denenerek yapılan ölçümler sonucu en uygun akış hızı 14 μ L/saniye, enjeksiyon hacmi ise 25 μ L olarak belirlendi. Optimum akış hızı ve enjeksiyon hacmi belirlenmiş akış enjeksiyon analiz sisteminde öncelikle CNT-GB kompozit elektrotların $1,0 \times 10^{-5}$ M- $1,0 \times 10^{-1}$ M standart $B_4O_7^{2-}$ çözeltilerinde sergilediği potansiyometrik davranışlar incelendi. Elde edilen verilerin pik yüksekliği değerleri ile kalibrasyon grafiği çizildi ve doğru denklemi

oluşturularak CNT-GB kompozit elektrotların hareketli ortamdaki tayin limiti belirlenmiştir.

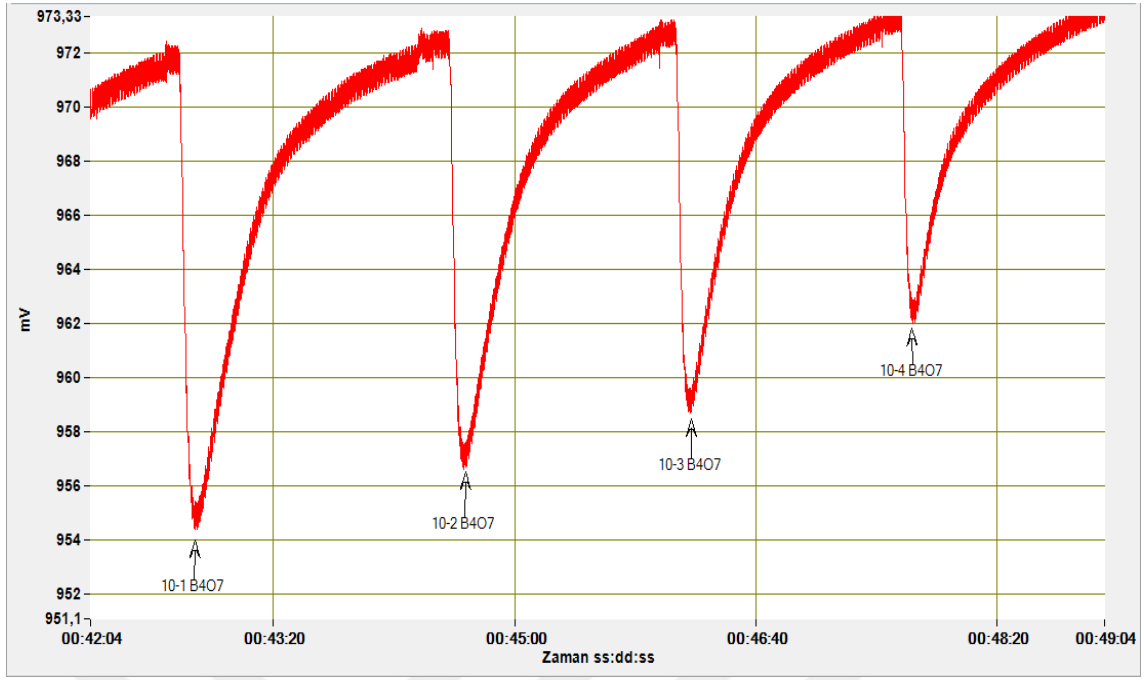


Şekil 6. 19 Akış enjeksiyon sistemde akış hızı ve enjeksiyon hacmi optimizasyonu ölçümlerinden bir örnek.

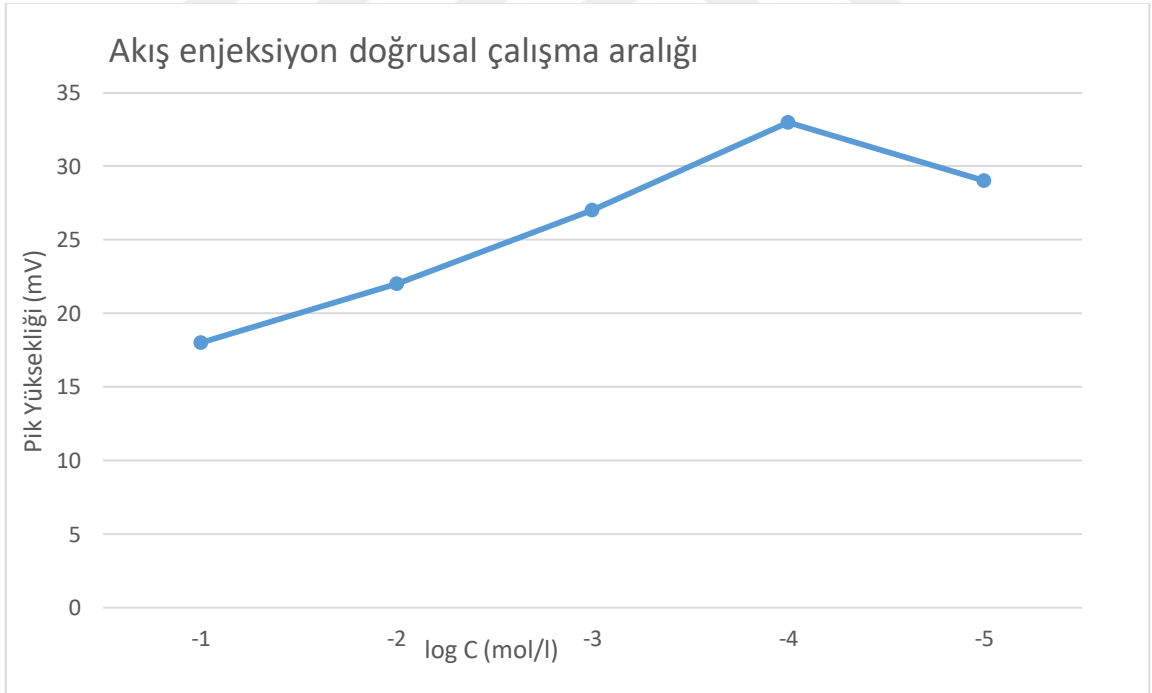
V: Enjeksiyon hacmi (μl), P: Hareketli faz akış hızı ($\mu\text{l/s}$), (a): $1,0 \times 10^{-1} \text{ M B}_4\text{O}_7^{2-}$, (b): $1,0 \times 10^{-2} \text{ M B}_4\text{O}_7^{2-}$, (c): $1,0 \times 10^{-3} \text{ M B}_4\text{O}_7^{2-}$, (d): $1,0 \times 10^{-4} \text{ M B}_4\text{O}_7^{2-}$ (e): $1,0 \times 10^{-5} \text{ M B}_4\text{O}_7^{2-}$

Yapılan çalışmalar sonucu akış enjeksiyon analiz sisteminde değişen $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ konsantrasyonlarına karşı elde edilen potansiyometrik sonuçlar Şekil 6.20’de verilmiştir. Hareketli faz $5 \times 10^{-5} \text{ M B}_4\text{O}_7^{2-}$ olarak ayarlanmıştır.

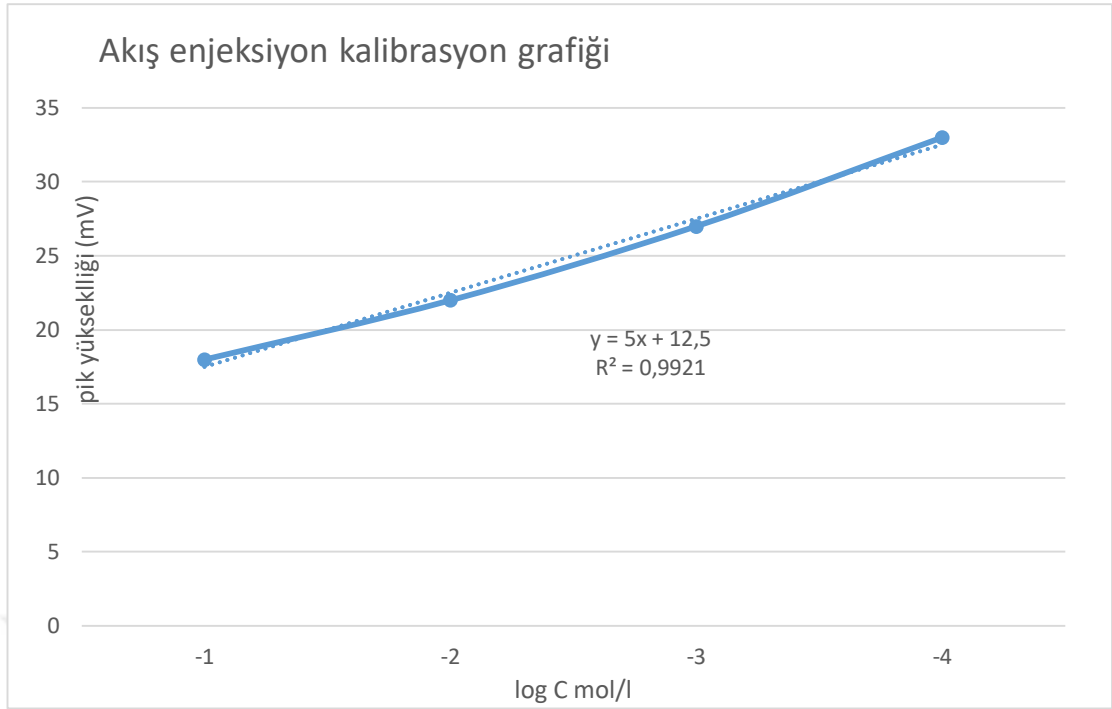
Geliştirilen iyon seçici elektrotların akış enjeksiyon sistemde doğrusal çalışma aralıkları ve kalibrasyon grafikleri pik yükseklikleri baz alınarak belirlenmiştir. Akış enjeksiyon analiz sisteminde yapılan potansiyometrik ölçümler sonucunda elektrotların $1,0 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-1} \text{ M}$ arasında standart $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ iyonlarına karşı doğrusal cevap sergilediği gözlemlendi. Şekil 6.21 ve Şekil 6.22’de CNT-GB kompozit elektrotların akış enjeksiyon sistemindeki doğrusal çalışma aralığı ve kalibrasyon grafiği yer almaktadır. Doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-1} \text{ M}$ olarak belirlenmiştir



Şekil 6. 20 Akış enjeksiyon sistemde CNT-GB elektrotların değişen $B_4O_7^{2-}$ iyon konsantrasyonlarına karşı sergilediği potansiyometrik cevaplar



Şekil 6. 21 CNT-GB kompozit elektrotların akış enjeksiyon sistemindeki doğrusal çalışma aralığı

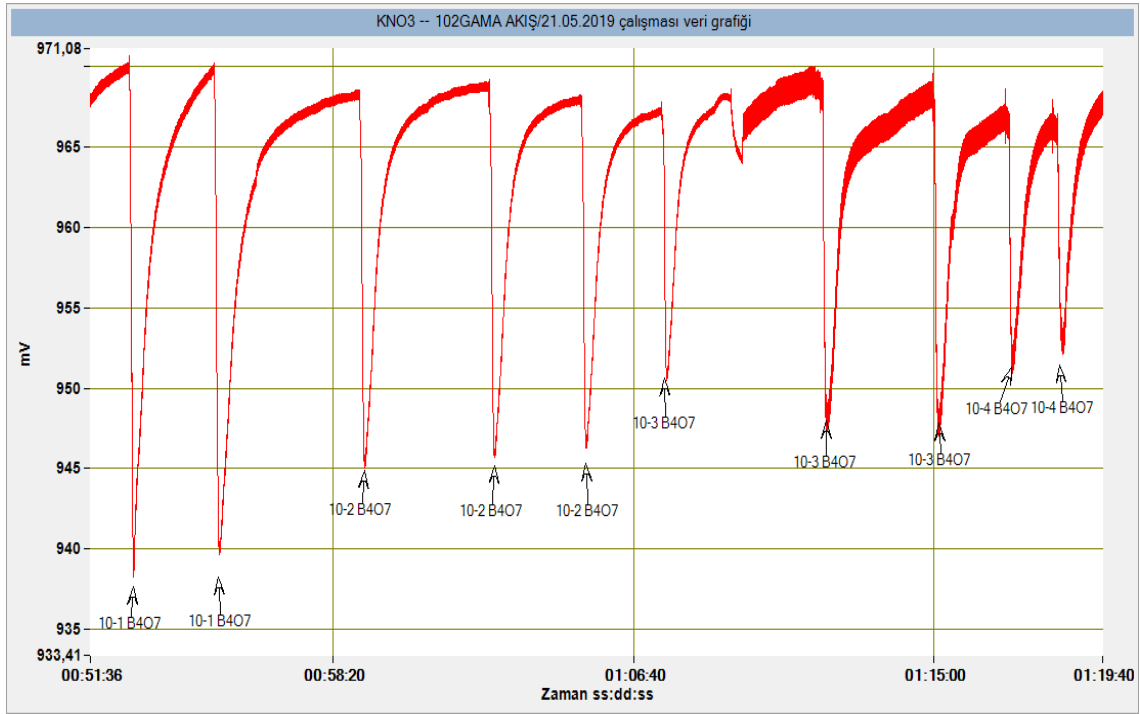


Şekil 6. 22 CNT-GB elektrotların akış enjeksiyon sistemindeki kalibrasyon grafiği

Elektrotların akış enjeksiyon analiz sistemindeki tayin limitinin $1,0 \times 10^{-4}$ M olduğu belirlendi. Akış enjeksiyon analiz sisteminde doğrusal çalışma aralığındaki potansiyel derişim ilişkisini veren doğru denklemi;

$Y = -5x(B_4O_7^{2-}) + 12,5$, R^2 değeri ise 0,9921 olarak belirlenmiştir.

CNT-GB-borat kompozit elektrotların akış enjeksiyon analiz sisteminde tekrarlanabilir sonuçlar verdiği gözlemlendi. Tekrarlanabilirliğin ölçülmesi için öncelikle $1,0 \times 10^{-1}$, $1,0 \times 10^{-2}$, $1,0 \times 10^{-3}$ M ve $1,0 \times 10^{-4}$ M standart $B_4O_7^{2-}$ çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin herbirinin saniyede 14 μ L akış hızında ilerleyen hareketli faz yardımıyla sisteme 25 μ L enjekte edilmesiyle oluşan potansiyel değişim değerlerinden pik yükseklikleri ölçülerek sonuç alındı. Her bir enjeksiyon 2-3 kez tekrar edildi. Şekil 6.23'de CNT-GB kompozit elektrotların tekrarlanabilirlik çalışması görülmektedir.



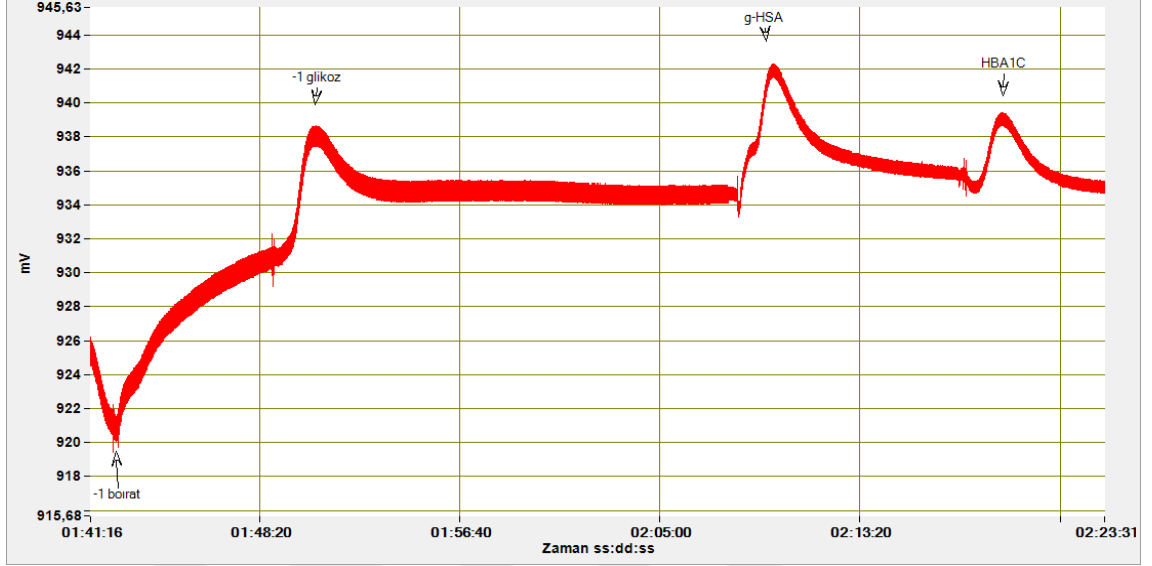
Şekil 6. 23 CNT-GB kompozit elektrotların akış enjeksiyon sistemde tekrarlanabilirlik çalışması

6.2.2 Akış Enjeksiyon Sistemde Standart Çözeltilere Karşı Alınan Potansiyometrik Yanıtlar

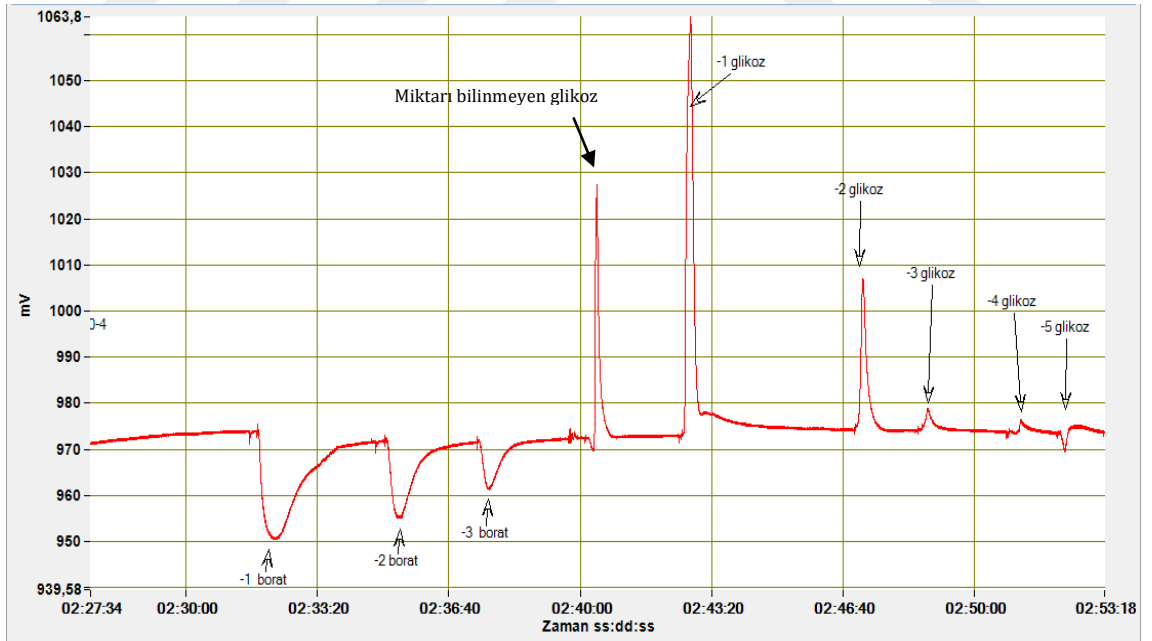
Şekil 6.24'de akış enjeksiyon sistemde ayrı ayrı standart glikoz-g-HSA-HbA1c enjeksiyonu sonucu alınan potansiyometrik sinyal gösterilmektedir. Hareketli faz 5×10^{-3} M $B_4O_7^{2-}$ olarak ayarlanmıştır. Beklenildiği üzere geliştirilen CNT-GB kompozit elektrotlar sisteme glikoz-g-HSA-HbA1c enjeksiyonu yapıldığında pozitif yönde yanıt vermiştir. Bu durum geliştirilen elektrotun glikoza, HbA1c ve g-HSA'ya karşı hareketli sistemde duyarlı olduğunu göstermektedir.

CNT-GB-borat kompozit elektrotların akış enjeksiyon analiz sisteminde standart çözeltilere karşı sergilediği potansiyometrik davranışı değerlendirebilmek için öncelikle standart glikoz çözeltileri hazırlanmıştır. Glikoz çözelti konsantrasyonları $1,0 \times 10^{-1}$, $1,0 \times 10^{-2}$, $1,0 \times 10^{-3}$ M, $1,0 \times 10^{-4}$ M ve $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde hazırlanmış ve akış enjeksiyon sisteme 25 µl hacimde 14 µl/s hızında verilerek potansiyometrik cevabı test edilmiştir. Şekil 6.25'de standart glikoz çözeltilerinin akış enjeksiyon sisteme enjekte edilmesi ile alınan potansiyometrik yanıt verilmiştir. CNT-GB

kompozit elektrotlar akış enjeksiyon sistemde $B_4O_7^{2-}$ iyonlarına karşı negatif yönde çalışırken, glikoz enjeksiyonuyla tam tersi yönde pik vermektedir. Elektrotların glikoza karşı seçici olduğu görülmektedir.

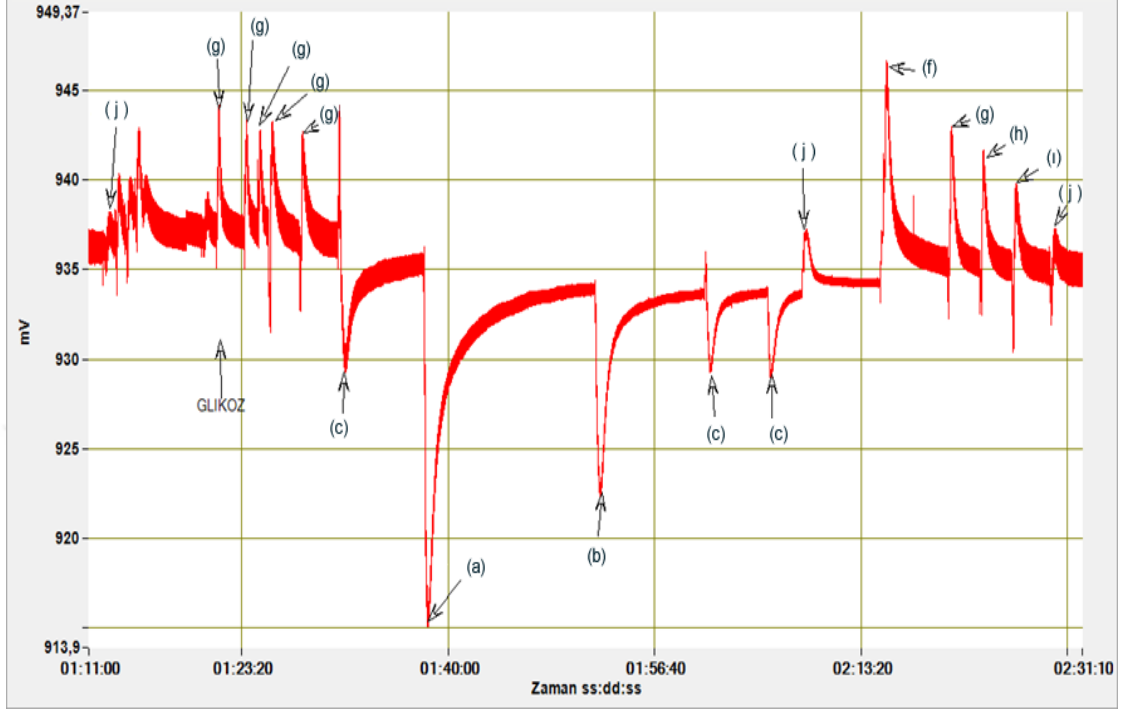


Şekil 6. 24 Akış enjeksiyon sistemde ayrım kolonu kullanılmadan glikoz-g-HSA-HbA1c enjeksiyonu ile alınan potansiyometrik yanıt



Şekil 6. 25 Standart glikoz çözeltilerinin akış enjeksiyon sisteme enjekte edilmesi ile alınan potansiyometrik yanıt

Şekil 6.26'da CNT-GB elektrotun glikoz ölçümünde tekrarlanabilirliği değerlendirilmiştir. Farklı konsantrasyon enjeksiyonuna karşı tekrarlı sonuçlar verdiği belirlenmiştir.



Şekil 6. 26 CNT-GB elektrotun glikoz ölçümünde tekrarlanabilirliği

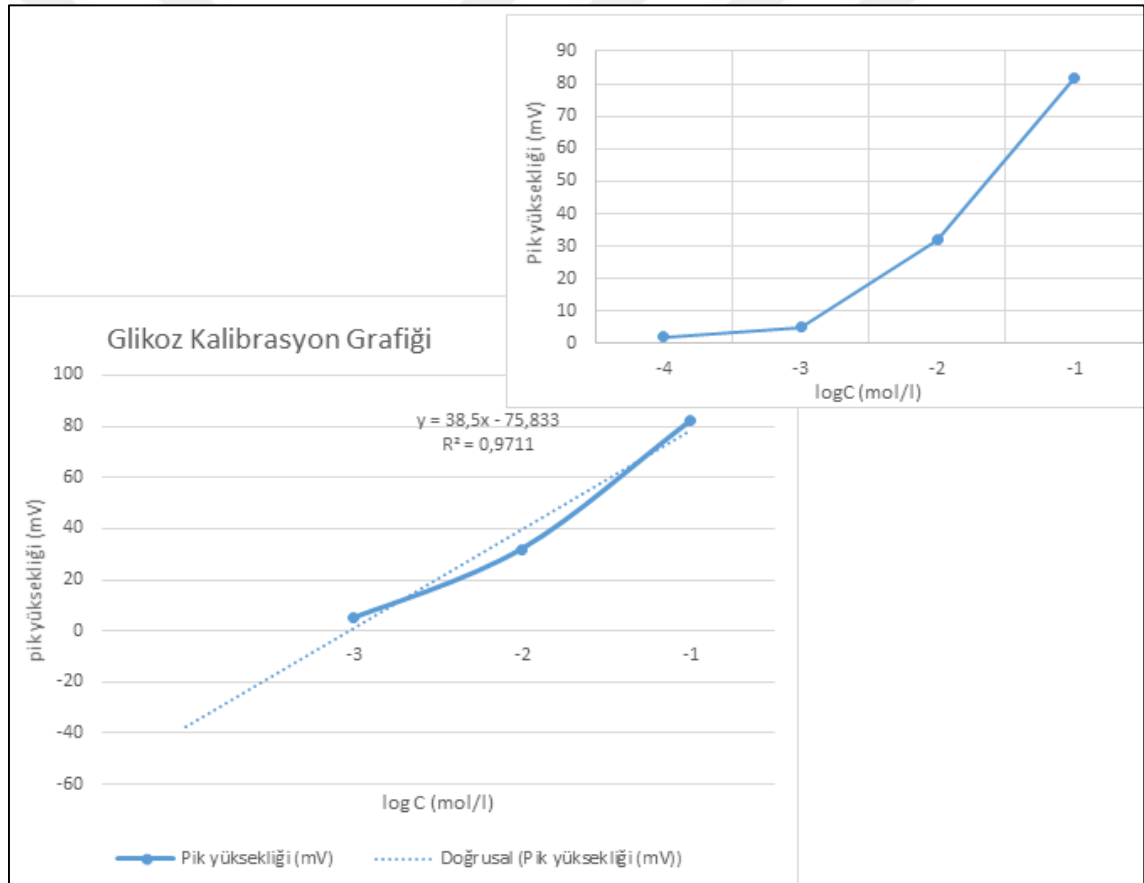
(a): $1,0 \times 10^{-1}$ M $B_4O_7^{2-}$, (b): $1,0 \times 10^{-2}$ M $B_4O_7^{2-}$, (c): $1,0 \times 10^{-3}$ $B_4O_7^{2-}$, (f): $1,0 \times 10^{-1}$ glikoz, (g): $1,0 \times 10^{-2}$ glikoz, (h): $1,0 \times 10^{-3}$ glikoz, (i): $1,0 \times 10^{-4}$ glikoz, (j): $1,0 \times 10^{-5}$ glikoz.

CNT-GB-borat kompozit elektrotların $1,0 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-1}$ M glikoz çözeltilerinde sergilediği potansiyometrik davranışlar incelendi. Elde edilen verilerin pik yüksekliği değerleri Tablo 6.4'de verilmiştir.

Şekil 6.27'de elde edilen glikoz pik yüksekliği değerleri ile kalibrasyon grafiği çizilerek doğru denklemi oluşturuldu. CNT-GB-borat kompozit elektrotların hareketli ortamdaki doğrusal çalışma aralığından glikoz tayin limiti belirlendi.

Tablo 6. 4 Akış Enjeksiyon Sistemde CNT-GB elektrotun glikoz pik yükseklik değerleri

logC (mol/l)	Pik yüksekliği (mV)
-4	2
-3	5
-2	32
-1	82



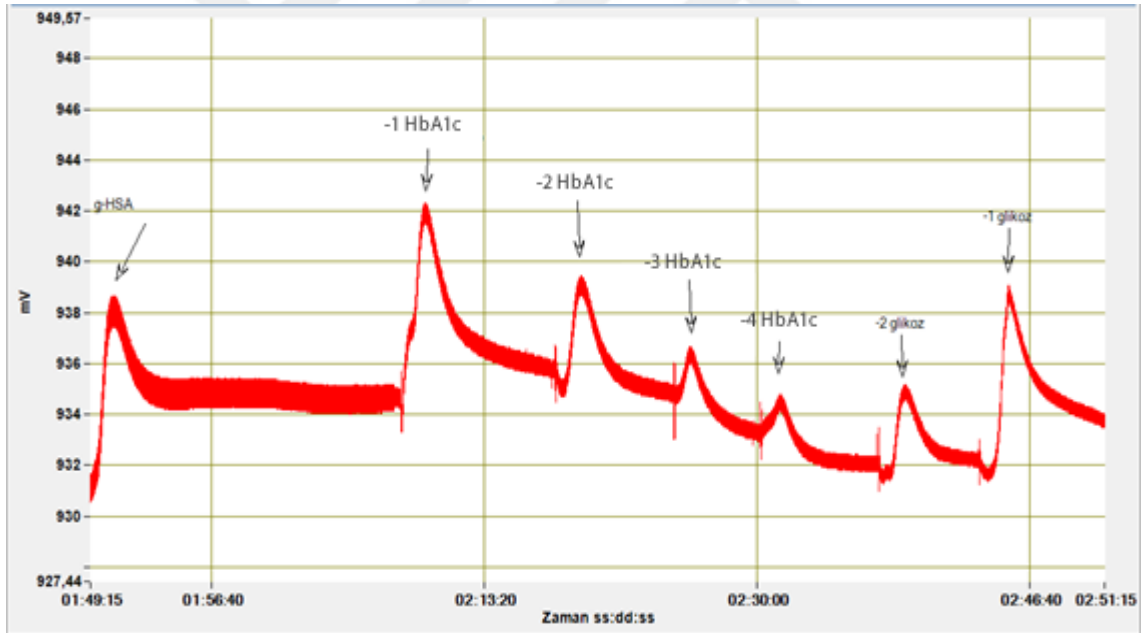
Şekil 6. 27 CNT-GB kompozit elektrotların akış enjeksiyon analiz sistemindeki glikoza karşı doğrusal çalışma aralığı ve kalibrasyon grafiği.

Akış enjeksiyon analiz sisteminde doğrusal çalışma aralığındaki potansiyel-derişim ilişkisini veren doğru denklemi;

$E = 38,5 \times (C_6H_{12}O_6) - 75,883$ ve R^2 değeri ise 0,9711 olarak belirlendi. Numune enjeksiyonu sonucu elde edilen ortalama pik yükseklikleri değerleri doğru denkleminde yerine yazılarak enjekte edilen karışımın içerdiği glikoz miktarı hesaplanabilmektedir.

CNT-GB-borat kompozit elektrotları kullanılarak akış enjeksiyon analiz sisteminde yapılan potansiyometrik ölçümler sonucunda elektrotların $1,0 \times 10^{-4} M$ - $1,0 \times 10^{-1} M$ arasında glikoza karşı doğrusal cevap sergilediği gözlemlendi. Elektrotların akış enjeksiyon analiz sistemindeki glikoz tayin limitinin ise $1,0 \times 10^{-4} M$ (20 µl enjeksiyon hacminde) olduğu belirlendi.

Şekil 6.28’de CNT-GB elektrotun akış enjeksiyon sistemde farklı konsantrasyonlarda HbA1c’ye verdiği potansiyometrik yanıt görülmektedir.



Şekil 6. 28 CNT-GB elektrotun farklı konsantrasyonlarda HbA1c’ye verdiği potansiyometrik yanıt

Geliştirilen elektrotlar HbA1c konsantrasyon artışına tutarlı yanıt vermiştir. Bu şekilde elde edilen pik yükseklik değerlerinden (Tablo 6.5) CNT-GB elektrotun

kalibrasyon eğrisi ve doğrusal çalışma aralığı (Şekil 6.29) elde edilerek HbA1c tayin limiti belirlenmiştir.

Akış enjeksiyon analiz sisteminde doğrusal çalışma aralığındaki potansiyel-derişim ilişkisini veren doğru denklemi;

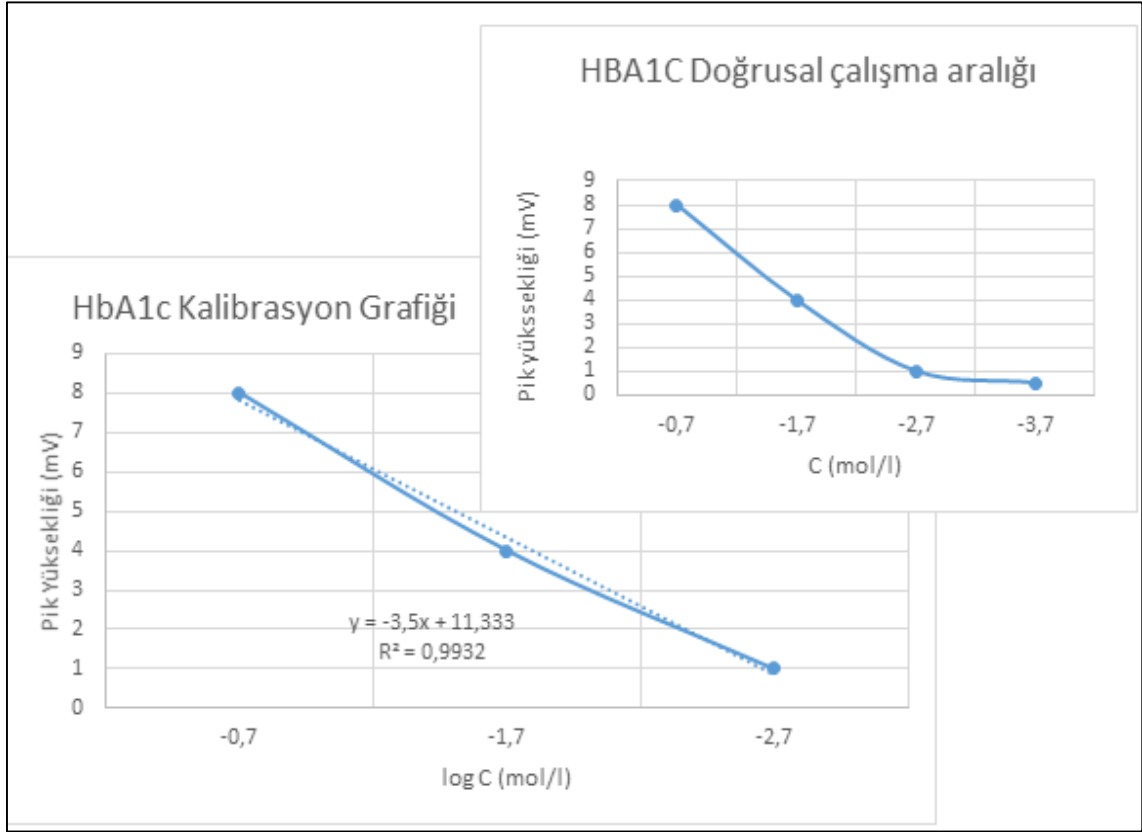
$E = -3,5 \times (\text{HbA1c}) + 11,333$ ve R^2 değeri ise 0,9932 olarak belirlendi. Numune enjeksiyonu sonucu elde edilen ortalama pik yükseklikleri değerleri doğru denkleminde yerine yazılarak enjekte edilen karışımdaki HbA1c miktarı hesaplanabilmektedir.

Tablo 6. 5 Akış enjeksiyon sistemde CNT-GB elektrotun verdiği HbA1c pik yükseklik değerleri

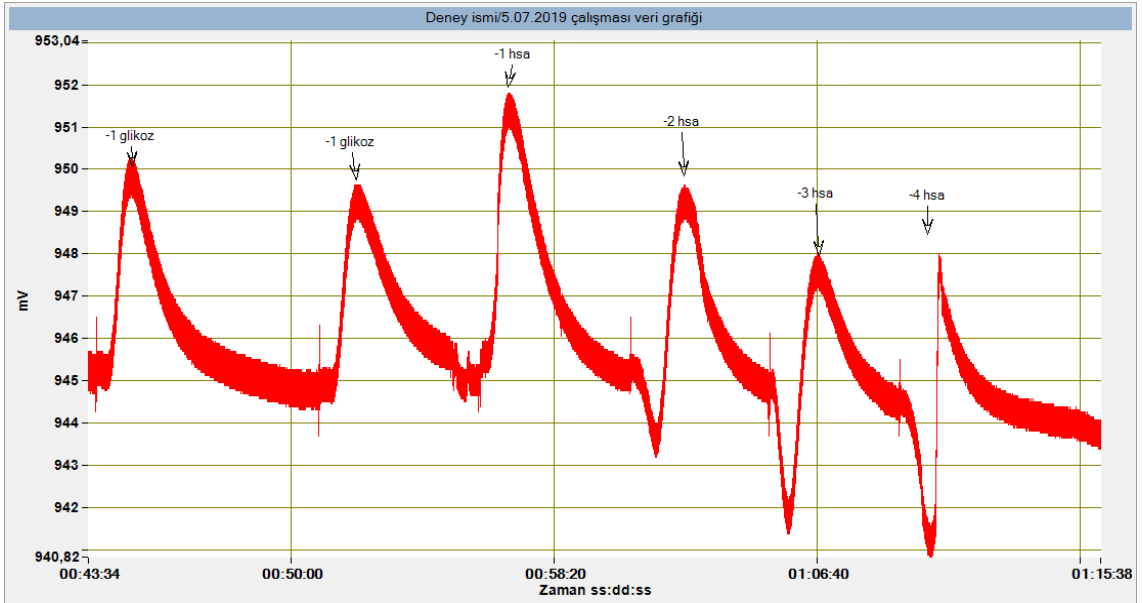
logC (mol/l)	Pik yüksekliği (mV)
0,7	8
1,7	4
2,7	1
3,7	0,5

CNT-GB-borat kompozit elektrotları kullanılarak akış enjeksiyon analiz sisteminde yapılan potansiyometrik ölçümler sonucunda elektrotların HbA1c doğrusal çalışma aralığının $2 \times 10^{-1} \text{ M} - 2 \times 10^{-3} \text{ M}$ HbA1c olduğu gözlemlendi. Elektrotların akış enjeksiyon analiz sistemindeki HbA1c tayin limitinin ise $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ (25 µl enjeksiyon) HbA1c olduğu belirlendi.

G-HSA'nın doğrusal çalışma aralığını ve tayin limitini belirlemek için de benzer prosedür uygulandı ve konsantrasyon artışına dayalı g-HSA performansı değerlendirildi. Şekil 6.30'da akış enjeksiyon sistemde farklı konsantrasyonlarda g-HSA enjeksiyonu sonucu alınan potansiyometrik yanıt verilmiştir.



Şekil 6. 29 CNT-GB-borat kompozit elektrotların akış enjeksiyon analiz sistemindeki HbA1c'ye karşı doğrusal çalışma aralığı ve kalibrasyon grafiği.



Şekil 6. 30 Akış enjeksiyon sistemde farklı konsantrasyonlarda g-HSA enjeksiyonu sonucu alınan potansiyometrik yanıt

Şekil 6.30'da 1×10^{-1} M- 1×10^{-4} M aralığında değişen konsntrasyonlarda g-HSA enjeksiyonu yapılarak potansiyometrik sonuç incelendiğinde konsantrasyon artışına doğru orantılı pikler elde edildiği görülmüştür.

Tablo 6. 6'da akış enjeksiyon sistemde CNT-GB elektrotun verdiği g-HSA pik yükseklik değerleri gösterilmektedir. Şekil 6. 31'de g-HSA kalibrasyon ve doğrusal çalışma aralığı grafiği verilmiştir.

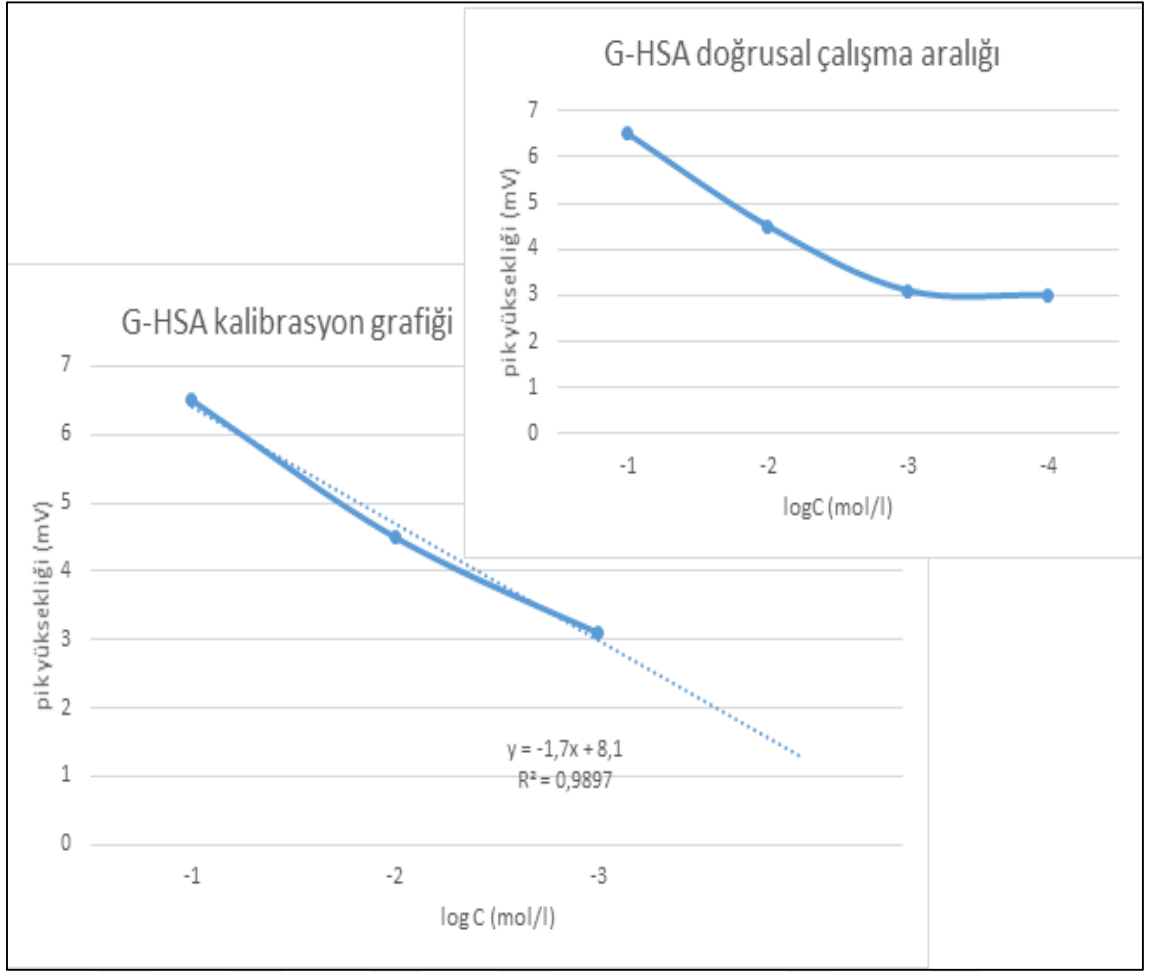
Akış enjeksiyon analiz sisteminde g-HSA'nın doğrusal çalışma aralığındaki potansiyel-derişim ilişkisini veren doğru denklemi;

$E = -1,7 \times (g\text{-HSA}) + 8,1$ ve R^2 değeri ise 0,9897 olarak belirlendi. Numune enjeksiyonu sonucu elde edilen ortalama pik yükseklikleri değerleri doğru denkleminde yerine yazılarak sisteme enjekte edilen karışımın içerdiği g-HSA miktarı hesaplanabilmektedir.

Tablo 6. 6 Akış enjeksiyon sistemde CNT-GB elektrotun verdiği g-HSA pik yükseklik değerleri

logC (mol/l)	Pik yüksekliği (mV)
-1	6,5
-2	4,5
-3	3,1
-4	3

Akış enjeksiyon analiz sisteminde g-HSA'nın doğrusal çalışma aralığı 1×10^{-1} ve 1×10^{-3} M aralığında olduğu belirlenmiştir. CNT-GB elektrotun g-HSA için minimum tayin sınırının 1×10^{-3} M (25 µl enjeksiyon hacminde) g-HSA olduğu görülmüştür.



Şekil 6. 31 G-HSA kalibrasyon eğrisi ve doğrusal çalışma aralığı grafiği

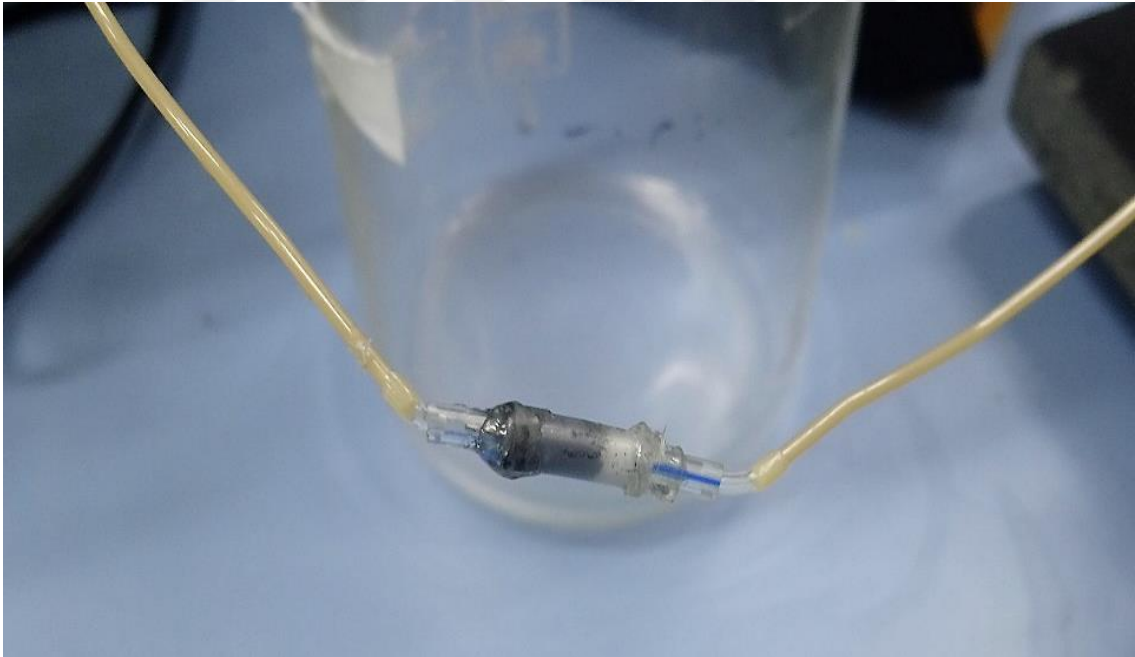
6.2.3 Akış Enjeksiyon Sisteme Ayırım/Reaksiyon Kolonu Eklenmesi

Akış enjeksiyon sisteme ayırım kolonu eklenerek kandaki glikozile proteinlerin ve glikozun ayrıştırılması ve ayrılan moleküllerin sıralı şekilde kolondan ayrılarak eş zamanlı potansiyometrik performansının ölçümünden miktar tayinlerinin yapılması hedeflenmiştir. Ayrıca ayırım kolonunun eklenmesiyle enjeksiyon yapılan standart çözeltiler ile hareketli fazdaki çözeltinin daha etkin karışabilmesi için de uygun ortam sağlandığı ve buna bağlı olarak daha iyi potansiyometrik yanıt alındığı gözlemlenmiştir.

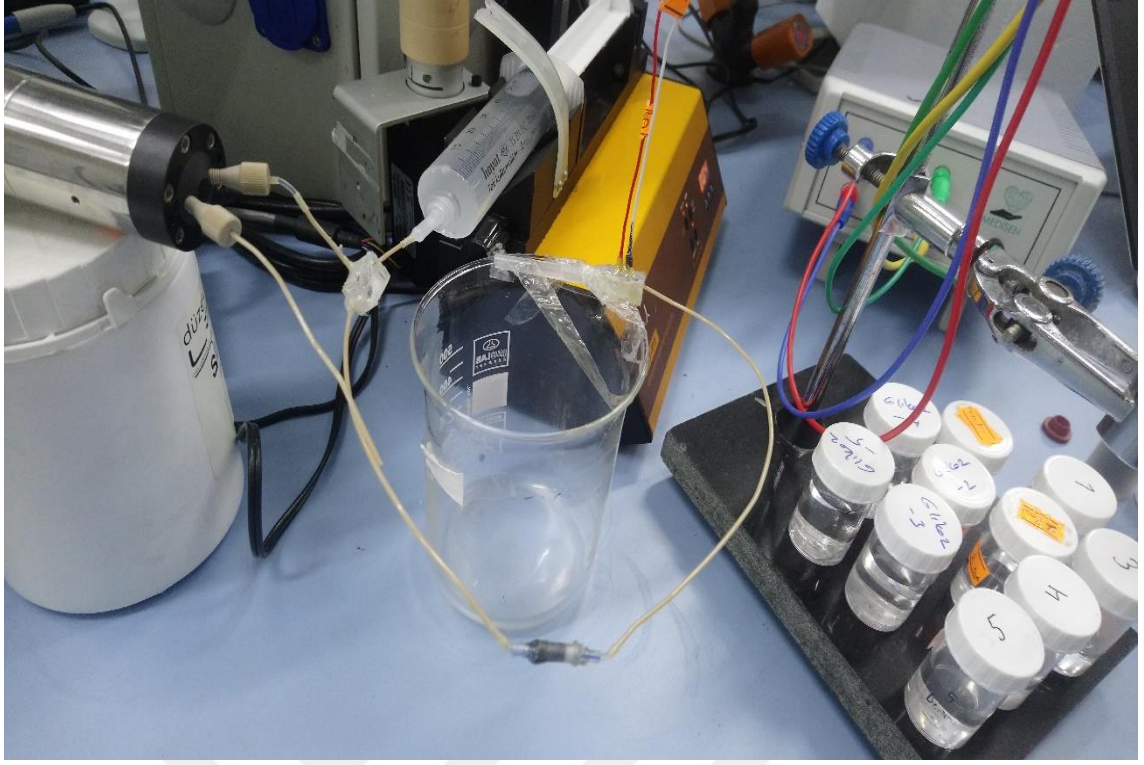
Şekil 6.32’de çalışmada kullanılan ayırım kolonu gösterilmiştir. Düz boru şeklinde bir ayırım kolonu tercih edilmiştir. Kolonun içine yerleştirilmek üzere grafit oksit-APBA bazlı bir kolon dolgusu sentezlenerek kullanılmadan önce metanol ve saf

sudan geçirilmiştir. Kolon ise kullanılmadan önce 1 gece boyunca 0.01 M HCl çözeltisi içinde bekletilerek sterilize edilmiştir. Akabinde hazır hale getirilen dolgu malzemesi kolona doldurulmuş (50 mg) ve iki ucundan pamuk tıkaç ile kapatılarak uygun boyutlardaki borularla sisteme bağlanmıştır. Şekil 6.33’de akış enjeksiyon sisteme ayırım kolonunun yerleştirilmesi gösterilmiştir.

Ayırım kolonu ile glikozile hemoglobin, glkozile albümin ve glikozun ayrılması çalışmasını yapabilmek için öncelikle standart çözeltiler ölçüme hazır hale getirilmiştir. Glikozile hemoglobin ve glkozile albümin 1ml ultra saf ile seyreltilip 24 saat boyunca 4 °C’de bekletilmiştir. Akabinde her iki standart da 3 farklı konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilmiştir. Standart glikoz, g-HSA ve HbA1c çözeltileri eşit oranda karıştırılarak sisteme enjekte edilmiş ve hareketli faz akış hızı ve enjeksiyon hacmi değiştirilerek sentezlenen kolon dolgu malzemesinin ayırıştırma kapasitesi belirlenmiş ve böylece HbA1c, g-HSA ve glikozun eş zamanlı ölçümü sağlanmıştır.



Şekil 6. 32 Çalışmada kullanılan ayırım kolonu



Şekil 6. 33 Akış enjeksiyon sisteme ayırım kolonunun yerleştirilmesi

Hazırlanan GO-APBA temelli kolon dolgu maddesi ile akış enjeksiyon sistemde glikoz, g-HSA ve HbA1c ayrışması eş zamanlı olarak potansiyometrik test edilmiş ve başarılı sonuç alınmıştır. Şekil 6.35’de bu ayrışma ve eş zamanlı ölçüm görülmektedir. GO-APBA bazlı kolon dolgu maddesindeki boratın, g-HSA ve HbA1c’deki glikozu bağlayarak ve molekül büyüklüklerine bağlı olarak kolonda hsa ve HbA1c’yi belli sürelerde tuttuğu belirlenmiştir. Moleküllerin sıralı bir şekilde kolonu terk etmeleri sağlanarak pik üzerinde dirsekler şeklinde potansiyometrik sinyal üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Böylece geliştirilen kolon bölmesi eş zamanlı ölçüm yapılabilmesini mümkün kılmıştır.

6.2.4 Akış Enjeksiyon Sistemde Standart Glikoz- g-HSA ve HbA1c’nin Eş Zamanlı Ölçümü

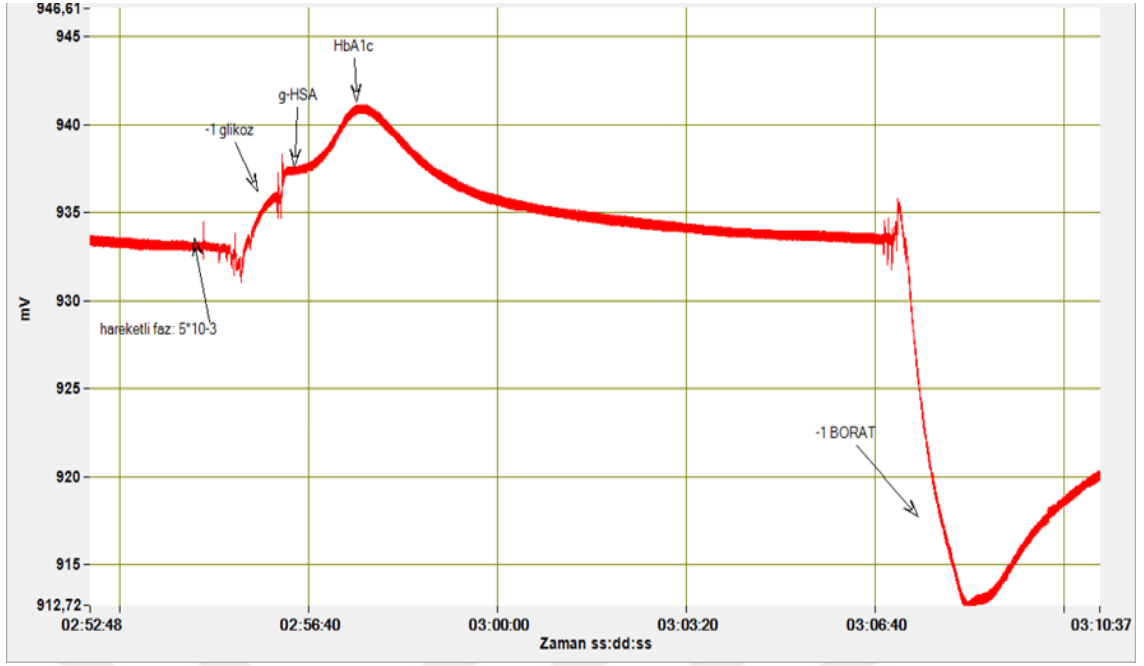
Akış enjeksiyon sistemde glikoz- HbA1c ve g-HSA’nın eş zamanlı ölçümü için taşıyıcı faz 5×10^{-3} M $B_4O_7^{2-}$ olarak ayarlanmıştır. Taşıyıcı fazın akış hızı 5, 15, 25, 30, 40 $\mu\text{l/s}$

olarak değiştirilerek GO-APBA temelli ayırım kolonunun glikoz, g-HSA ve HbA1c'yi ayırması ve eş zamanlı potansiyometrik yanıtları değerlendirilmiştir.

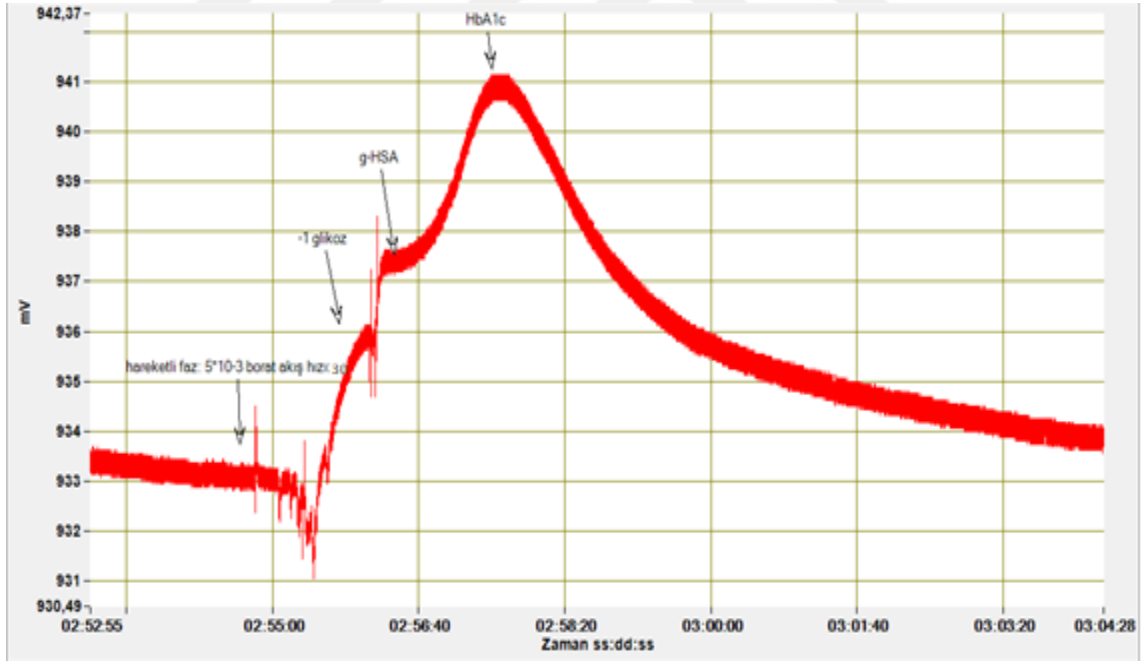
Şekil 6.34 ve Şekil 6.35'de CNT-GB elektrotun glikoz, g-HSA ve HbA1c'ye karşı potansiyometrik yanıtları görülmektedir. Sonuç, beklenildiği üzere pozitif yönde ve peşisıra ve/veya birleşik pikler şeklinde olmuştur.

Şekil 6.34'de sisteme standart HbA1c, g-HSA ve glikoz karışımı enjeksiyonu ardından tekrar borat enjeksiyonu yapıldığında potansiyometrik yanıtın beklenildiği üzere borata karşı negatif yönde tekrar ettiği görülmektedir. Bu durum geliştirdiğimiz CNT-GB elektrotun HbA1c-g-HSA-glikoza karşı duyarlı ve tekrarlanabilir potansiyometrik yanıt verdiğini göstermektedir.

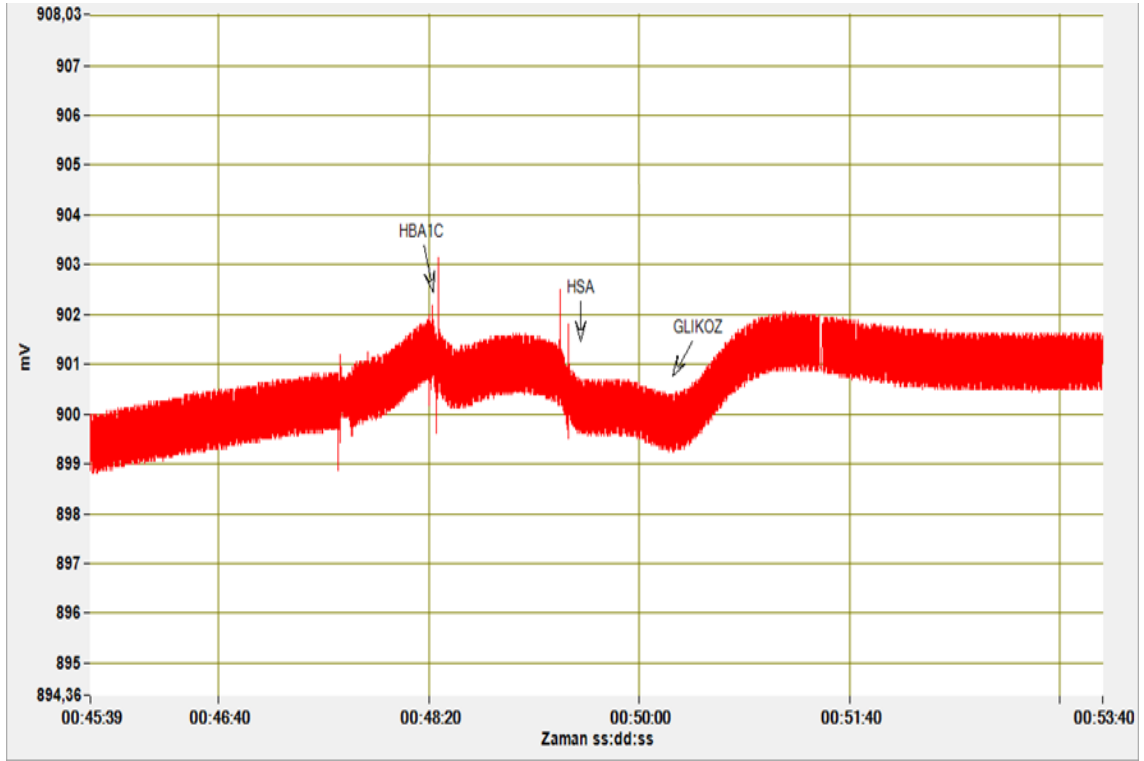
Şekil 6.35'de HbA1c-Glikoz-G-HSA'nın kolonda ayrışmaları ardından CNT-GB elektrotun glikoz-g-HSA-HbA1c'ye verdiği potansiyometrik yanıt görülmektedir. HbA1c, g-HSA ve glikoz, molekül büyüklüklerine ve borat-glikoz ilgisine bağlı olarak kolondan ayrılmıştır. En küçük molekül glikoz olduğundan kolonu ilk olarak glikoz terk etmiştir. Dolayısıyla pikte gördüğümüz ilk dirsek glikoza ait sinyali göstermektedir. Ardından gelen dirsek ise g-HSA'e aittir. Çünkü hem G-HSA'nın molekül boyutu glikozdan daha büyüktür ki bu durum kolondan G-HSA'nın kısmi gecikmeli ayrılmasına neden olmaktadır; hem de kolon dolgu malzemesindeki (GO-APBA) borat, g-HSA'daki glikoza bağlanarak g-HSA'nın kolonda tutunup bir süre daha gecikmeli olarak kolonu terk etmesine neden olmuştur. Bu şekilde pikte yer alan ikinci dirseğin g-HSA'ya ait olduğu belirlenmiştir. Benzer prensipe dayanarak üçüncü dirseğin de HbA1c'ye ait olduğu belirlenmiştir. Çünkü HbA1c diğer iki moleküle göre daha büyüktür ve kolondaki borat ve glikoz ilgisinden dolayı kolonda daha uzun süre tutulduğundan kolonu en geç terkeden molekülün HbA1c olduğu düşünülerek potansiyometrik yanıtlar değerlendirilmiştir. Farklı hareketli faz akış hızları denenerek optimum glikoz-g-HSA-HbA1c ayrışması belirlenmeye çalışılmıştır. CNT-GB elektrotun glikoz-g-HSA-HbA1c verdiği potansiyometrik yanıtlar Şekil 6.36-40'da verilmiştir. Sırasıyla akış hızı 40-30-25-15-5 $\mu\text{l/s}$ olarak sisteme enjekte edilmiştir. Akış hızı düşürüldükçe piklerin ayrıldığı ve pikler arası mesafenin arttığı gözlemlenmiştir.



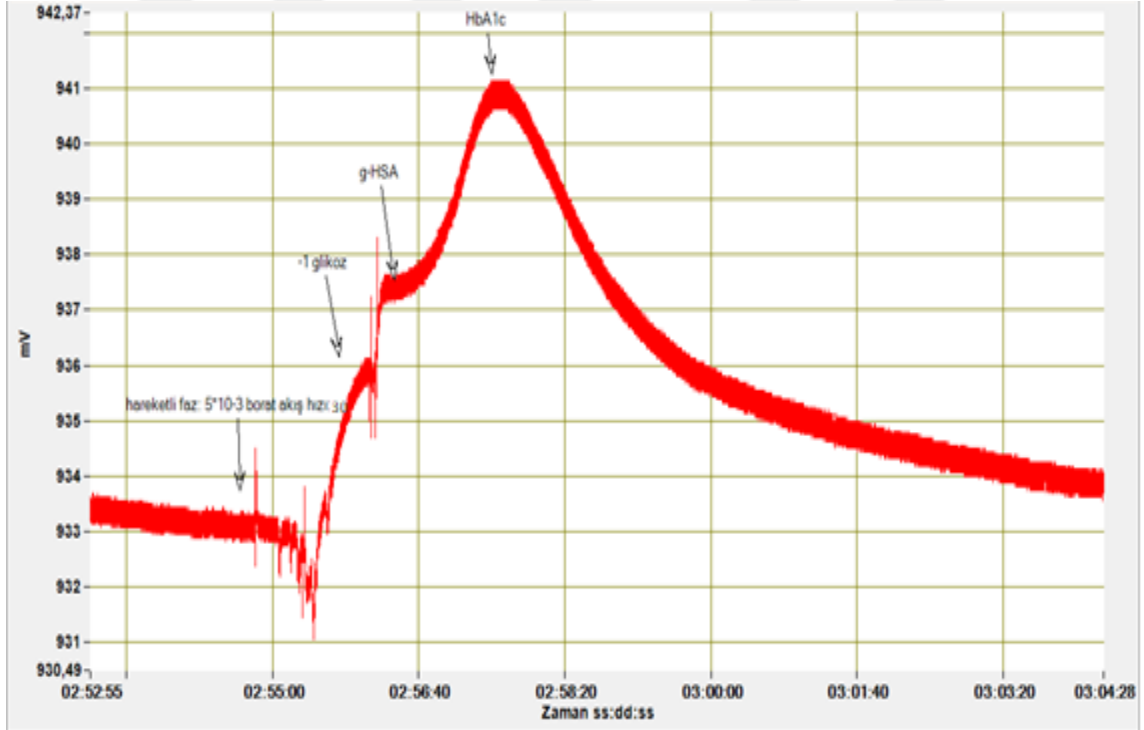
Şekil 6. 34 CNT-GB elektrotun glikoz-g-HSA-HbA1c'ye ve 1×10^{-1} M borata verdiği potansiyometrik yanıt



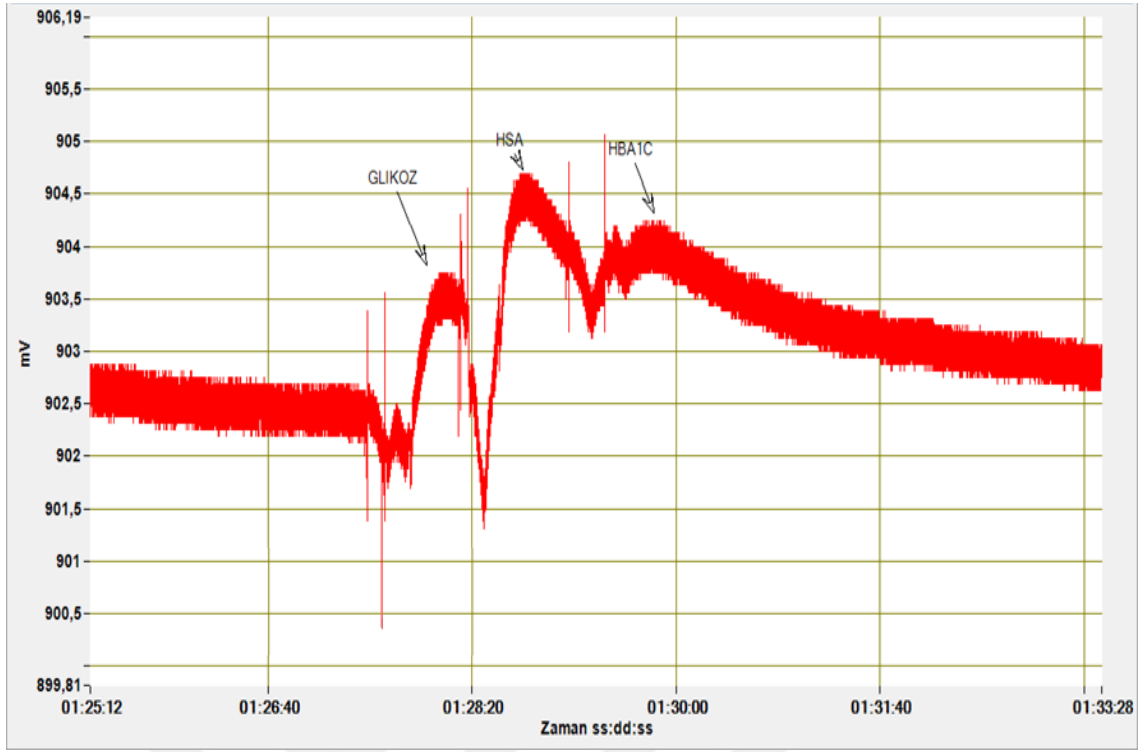
Şekil 6. 35 Glikoz-g-HSA- HbA1c'nin kolonda ayrışmaları sonucu eş zamanlı ölçüm. CNT-GB elektrotun akış hızı 30 μ l/s iken glikoz-g-HSA-HbA1c'ye verdiği potansiyometrik yanıt



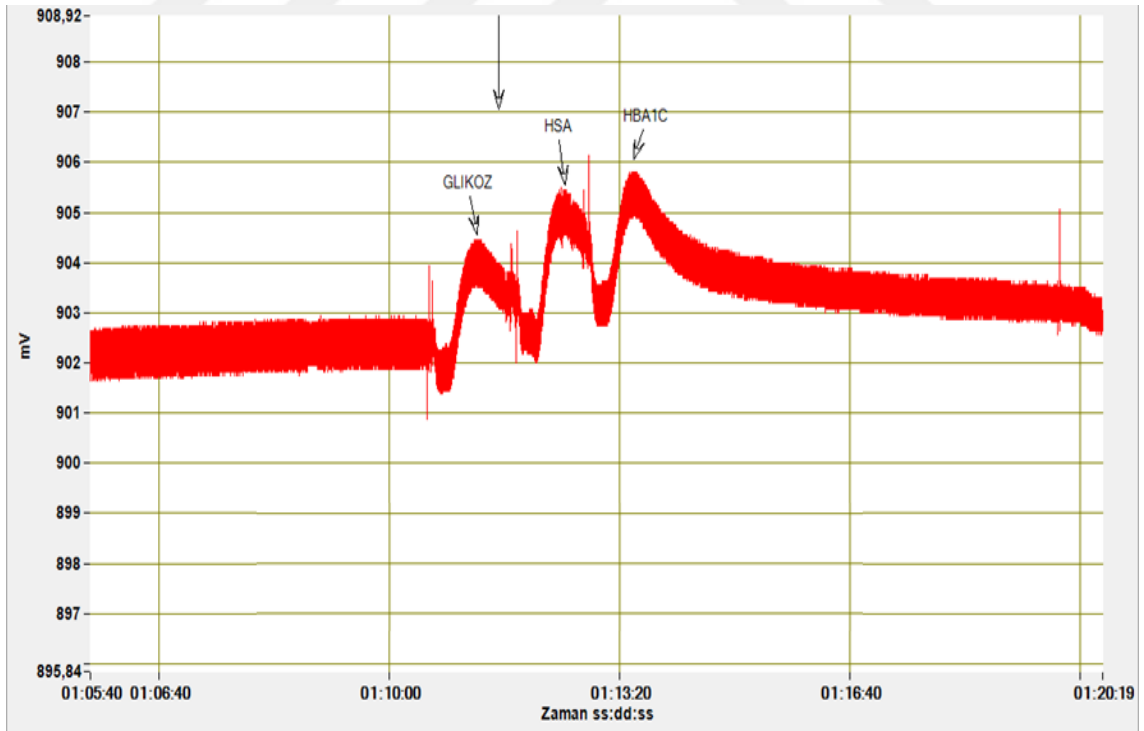
Şekil 6. 36 Akış hızı 40 µl/S iken alınan potansiyometrik sonuç



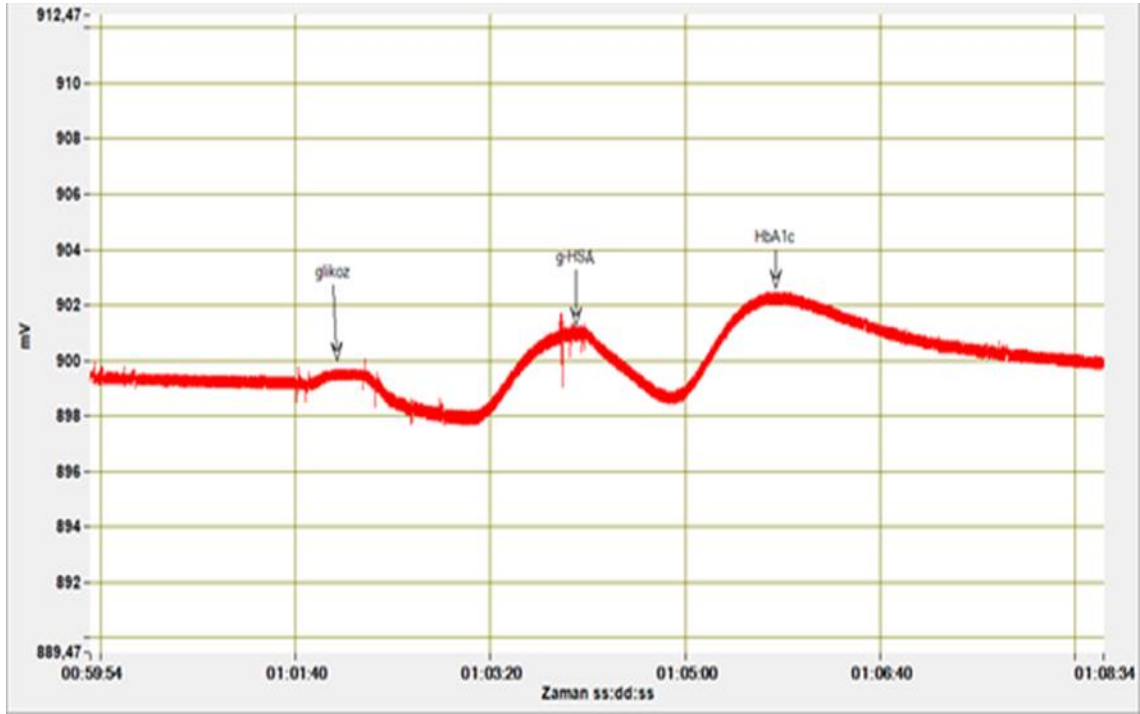
Şekil 6. 37 Akış hızı 30 µl/s iken alınan potansiyometrik sonuç



Şekil 6. 38 Akış hızı 25 µl/s iken alınan potansiyometrik sonuç



Şekil 6. 39 Akış hızı 15 µl/s iken alınan potansiyometrik sonuç



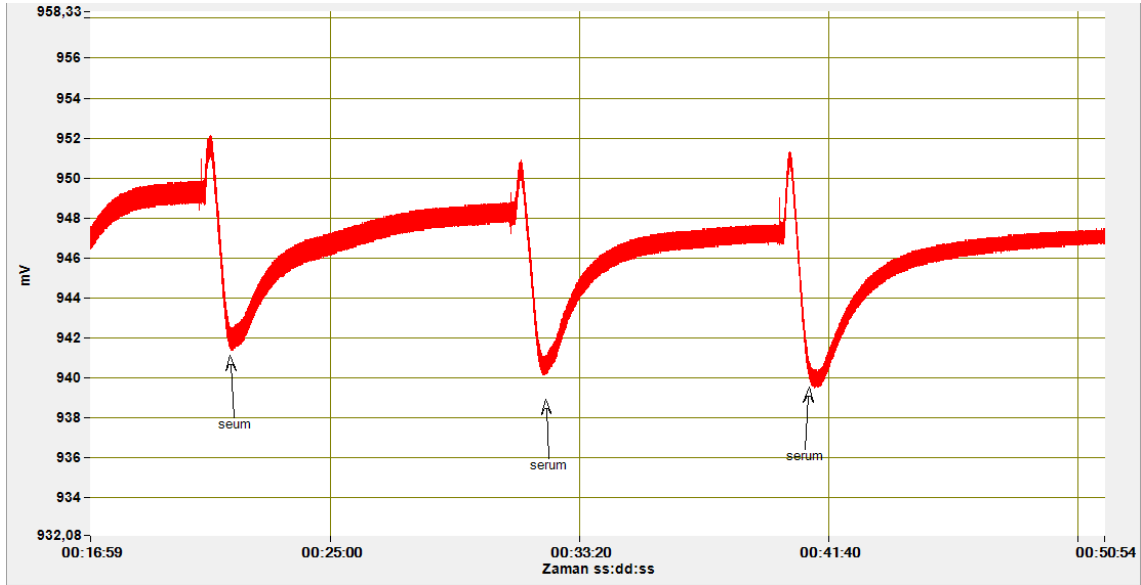
Şekil 6. 40 Akış hızı 5 µl/s iken alınan potansiyometrik sonuç

Şekil 6.36'da akış hızı 40 µl/s iken alınan potansiyometrik yanıt verilmiştir. 40 µl/s akış hızında piklerin anlamlı düzeyde oluşmadığı yani kolondaki glikoz, HbA1c ve g-HSA potansiyometrik sinyal alınamadan sürüklendiği görülmektedir. Bu durum numune karışımındaki HbA1c, g-HSA ve glikozun yeterince ayrılabilmesi için akış hızının çok yüksek olduğunu göstermektedir. Şekil 6.40'da akış hızı 5 µl/S'ye düşürüldüğünde piklerin tamamen ayrıldığı görülmektedir ancak ölçüm süresi çok uzun olmaktadır. Ölçümün daha hızlı ve daha ekonomik olması için akış hızının optimum düzeyde olması gerekmektedir. Akış hızı 30 µl/S olduğu durumda (Şekil 6.37) alınan sonucun eş zamanlı ölçüm yapılabilmesi için yeterli olduğu görülmektedir.

6.2.5 Akış Enjeksiyon Sistemde Seruma Standart ilavesi ile Yapılan Eş zamanlı Potansiyometrik Ölçümler

Akış enjeksiyon sistemde standart glikoz, g-HSA ve HbA1c'nin eş zamanlı ölçümü tamamlandıktan sonra seruma standart ilavesi ile ölçüm alınarak CNT-GB elektrotların potansiyometrik performansı, standart çözeltilerle alınan ölçümlerle

karşılaştırılmıştır. Karışımında kullanılan serum 10 ml % 0.9 izotonik sodyum klorür çözeltisidir. Serum fizyolojik, kan serumu ile fiziksel olarak benzer bir yapıdadır. 3 ml serum fizyolojik içerisine eşit hacimde (1'er ml) standart 1×10^{-1} M glikoz, 1×10^{-1} M g-HSA ve 2×10^{-1} M HbA1c eklenmiştir. Elde edilen yapay kan benzeri karışım sisteme 100 μ l/s numune enjeksiyon hızıyla ve 25 μ l hacimde enjekte edilerek potansiyometrik ölçümler alınmıştır. Hareketli faz 5×10^{-3} M borat çözeltisi olup akış hızı 30 μ l/s olarak ayarlanmıştır. Öncelikle sadece serum sisteme enjekte edilmiştir. Şekil 6.41'de akış enjeksiyon sisteme sadece serum enjeksiyonu yapılarak alınan potansiyometrik yanıt görülmektedir. Serum beklenildiği üzere negatif yönde pik vermiştir.

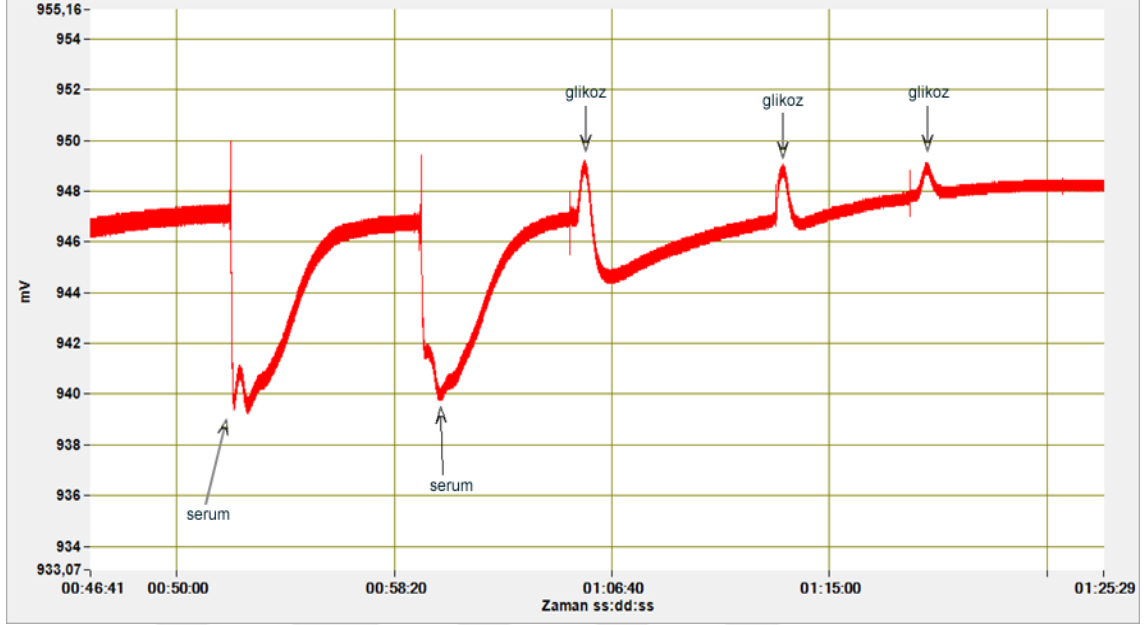


Şekil 6. 41 Akış enjeksiyon sisteme sadece serum enjeksiyonu yapılarak alınan potansiyometrik yanıt

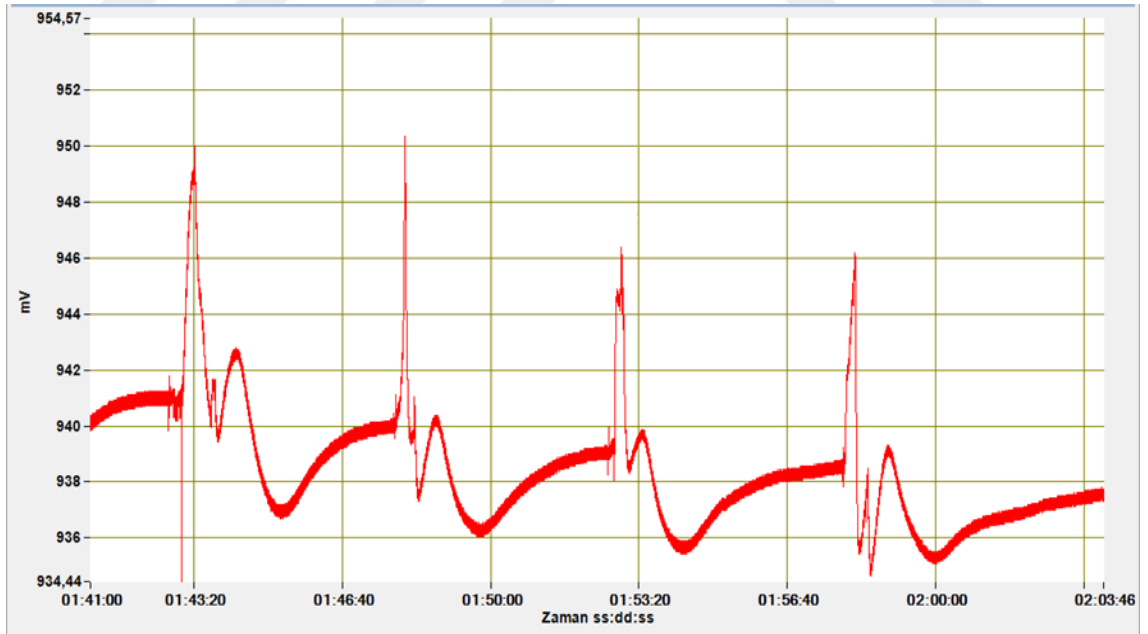
Şekil 6.42'de serumdan sonra sisteme glikoz enjeksiyonu yapılarak elektrotların duyarlılığı tekrar kontrol edilmiştir. Serumdan sonra beklenildiği üzere glikoza karşı pozitif yönlü pikler gözlemlenmiştir.

Akabinde serum ilaveli standart çözelti karışımı sisteme enjekte edilerek potansiyometrik performans değerlendirilmiştir. Ölçüm alınırken sistemdeki hareketli faz 5×10^{-3} M $B_4O_7^{2-}$ olarak ayarlanmıştır. Elde edilen pikler farklı akış hızlarında (5-10-15-25 μ l/s) değerlendirilerek optimum performans belirlenmeye

alışılmıştır. şekil 6. 43’de akış enjeksiyon sistemde farklı akış hızlarında seruma standart ilavesi ile alınan potansiyometrik sonuçlar verilmiştir.



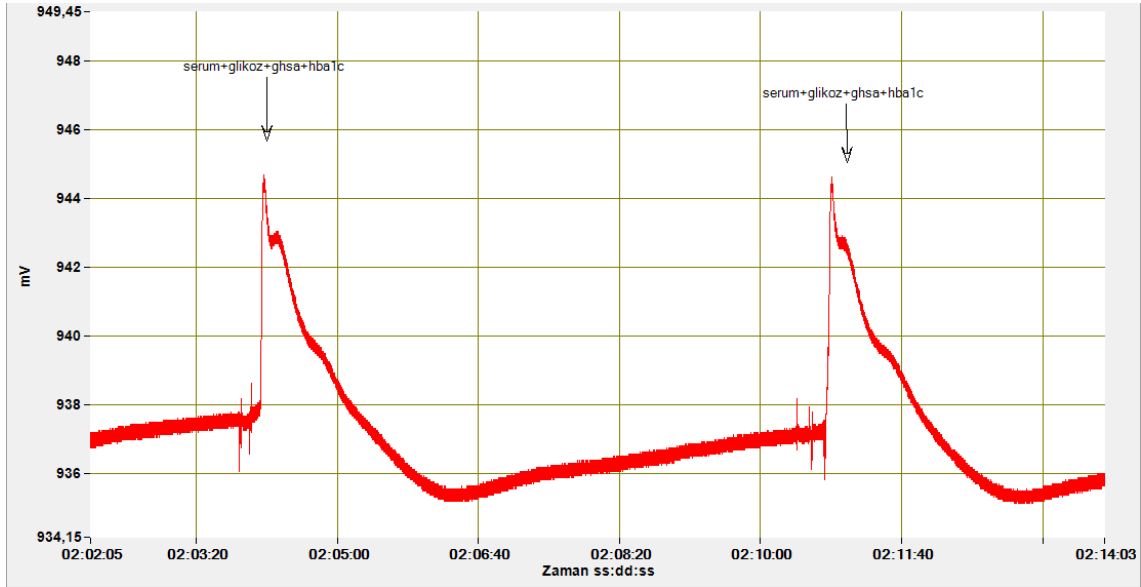
şekil 6. 42 Serumdan sonra sisteme glikoz enjeksiyonu yapılarak alınan potansiyometrik yanıt



şekil 6. 43 Akış enjeksiyon sistemde farklı akış hızlarında (20 µl/s altı) seruma standart ilavesi ile alınan potansiyometrik sonuçlar

Potansiyometrik sonuçlardan CNT-GB kompozit elektrotların belirgin bir şekilde glikoz, g-HSA ve HbA1c'yi eş zamanlı olarak seçtiği görülmektedir. Düşük akış hızlarında (20 μ l/s altı) ölçüm alındığında piklerin belirgin bir şekilde ayrıldığı, 20-25 μ l/s akış hızlarında ise dirsekli pik şeklinde sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu sonuç standart karışım ölçümleri ile paraleldir.

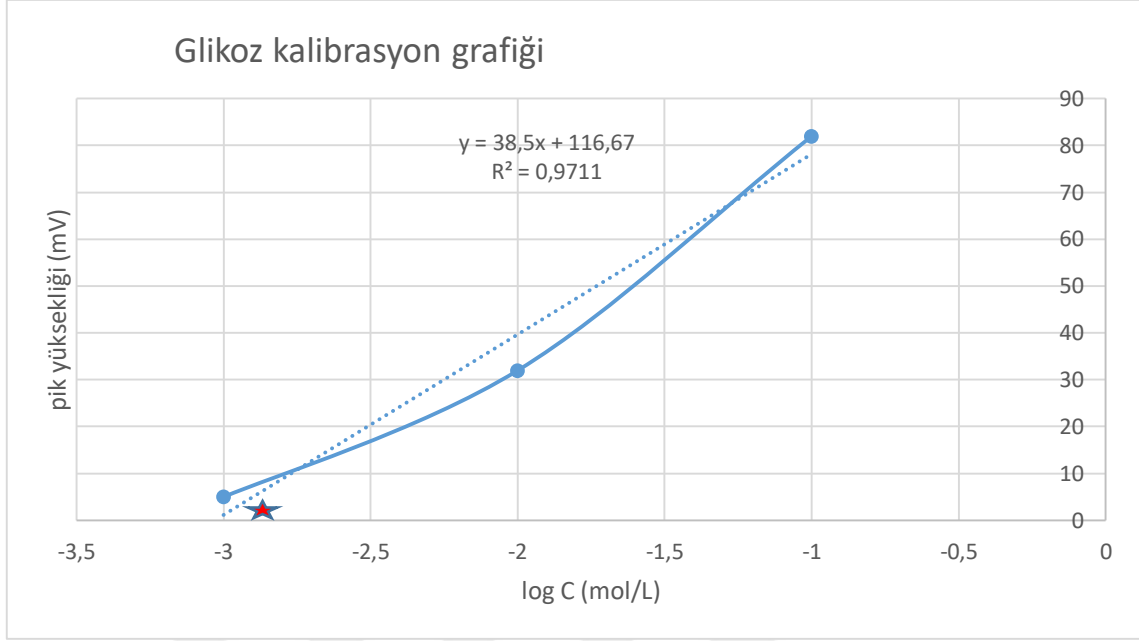
Daha hızlı ve ekonomik sonuç alınacağı düşünüldüğünden 25 μ l/s akış hızında optimum performans belirlenmiştir. Şekil 6. 44'de akış enjeksiyon sistemde seruma standart ilavesi ile alınan optimum tekrarlı potansiyometrik sonuç (25 μ l/s) görülmektedir. Alınan pikte görülen dirseklerin sırasıyla glikoz, g-HSA ve HbA1c'ye ait olduğu düşünülmektedir.



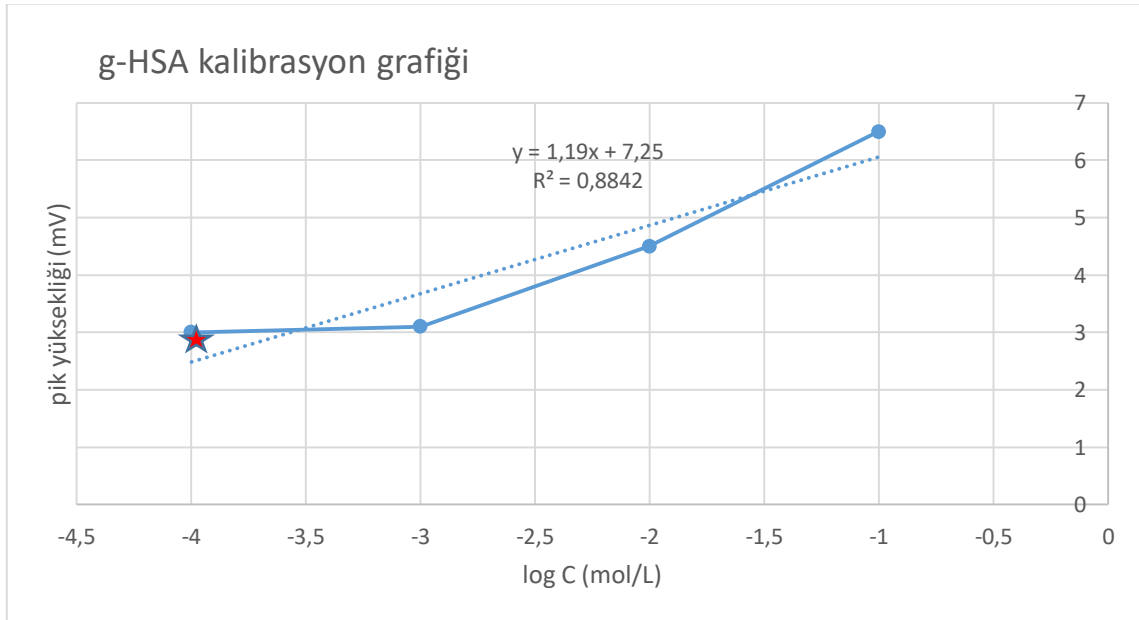
Şekil 6. 44 Akış enjeksiyon sistemde seruma standart ilavesi ile alınan optimum tekrarlı potansiyometrik sonuç (25 μ l/s)

Bölüm 6.2.2'de glikoz, g-HSA ve HbA1c için oluşturulan kalibrasyon grafikleri kullanılarak Şekil 6.44'deki seruma standart ilavesi ile elde edilen potansiyometrik pikler değerlendirilmiştir ve numunedeki glikoz, g-HSA ve HbA1c miktarları tespit edilmeye çalışılmıştır. Şekil 6.45-46-47'de bölüm 6.2.3'de belirlenen kalibrasyon grafikleri üzerine şekil 6.44'de alınan glikoz, g-HSA ve HbA1c pik yükseklik değerleri işaretlenmiştir. Grafik içerisinde verilen doğru denklemine, elde edilen pik

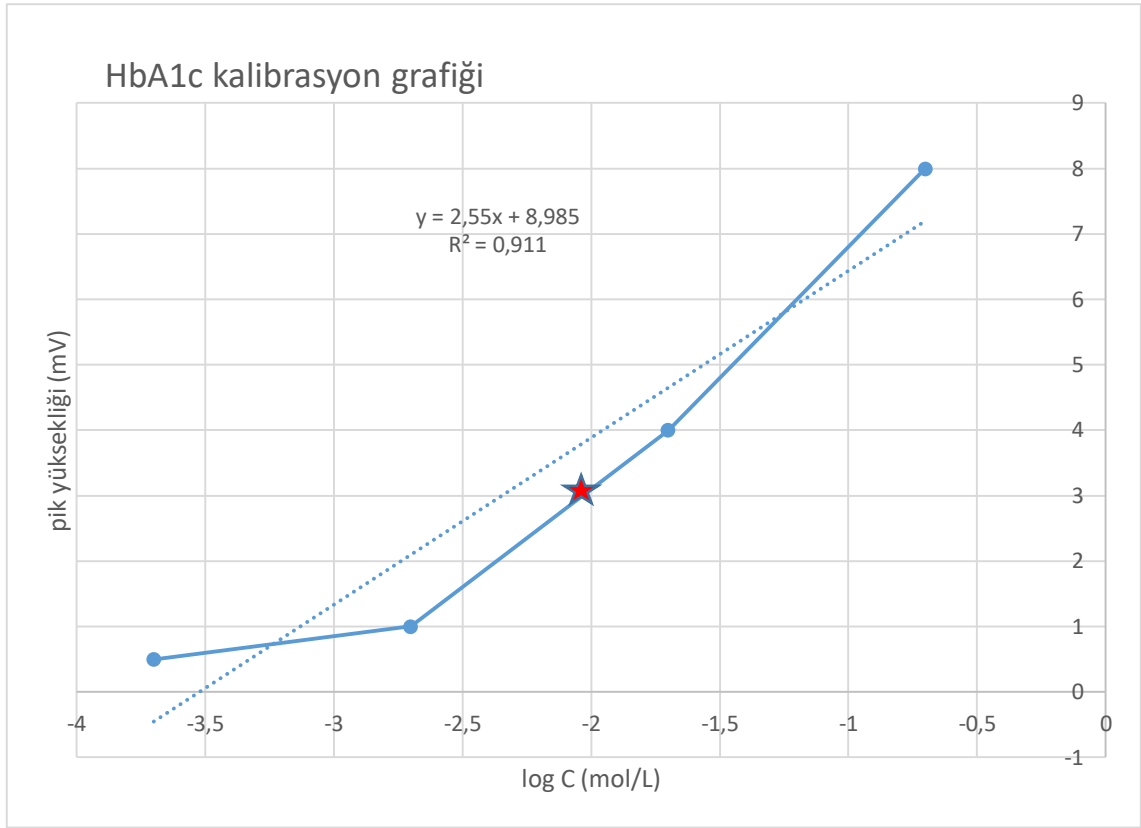
yükseklikleri yazılarak serumlu karışım içerisindeki glikoz, g-HSA ve HbA1c konsantrasyon değerleri belirlenmiştir.



Şekil 6. 45 Kalibrasyon grafiği üzerinde glikoz konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi



Şekil 6. 46 Kalibrasyon grafiği üzerinde g-HSA konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi



Şekil 6. 47 Kalibrasyon grafiği üzerinde HbA1c konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi

Elde edilen serumdaki glikoz, g-HSA ve HbA1c miktarları ile başlangıçta karışım hazırlanırken eklenen standart glikoz, g-HSA ve HbA1c miktarlarının tutarlı sonuç verdiği görülmüştür. Standart ilaveli serum karışımı; 3 ml serum fizyolojik içerisine eşit hacimde (1'er ml) standart 1×10^{-1} M glikoz, 1×10^{-1} M g-HSA ve 2×10^{-1} M HbA1c eklenerek hazırlanmıştır. Tablo 6.7'de kalibrasyon grafiklerinden belirlenen doğru denklemleri kullanılarak hesaplanan glikoz, g-HSA ve HbA1c konsantrasyon ve miktarları verilmiştir. 25 µl lik standart ilaveli bir serum karışımı içerisinde 0,0065 mg glikoz, 0,0013 mg g-HSA ve 0,0073 mg HbA1c olduğu hesaplanmıştır.

Tablo 6. 7 Şekil 6.44'deki ölçümün kalibrasyon grafikleri kullanılarak hesaplanan miktar tayinleri

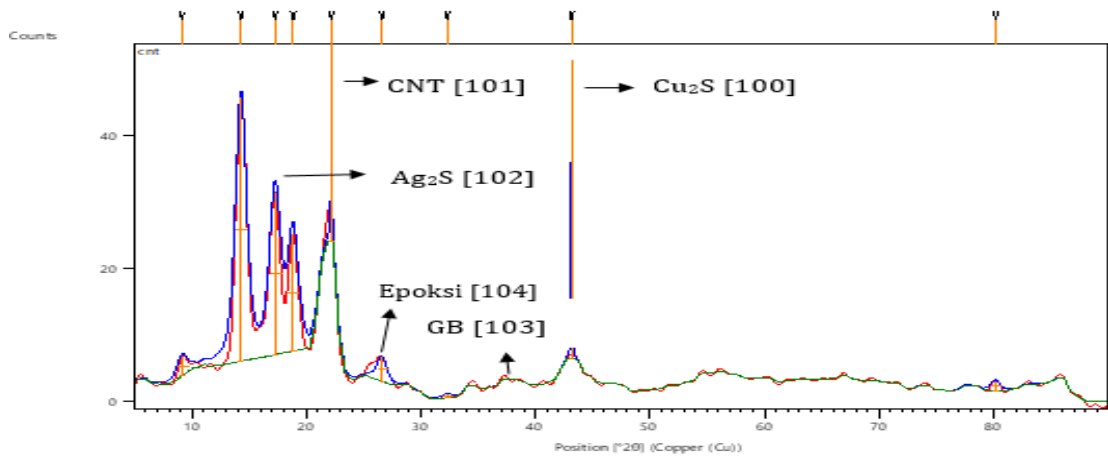
Belirlenen molekül	Pik yüksekliği (mV)	log C (mol/L)	Miktar (mg)
Glikoz	7	2,84	0,0065
G-HSA	3	3,09	0,0013
HbA1c	3	2,34	0,0073

6.3 Elektrot Ve Kolon Dolgu Malzemesinin XRD, FTIR VE SEM Analizleri

Bu bölümde geliştirilen elektrot ve kolon dolgu malzemesinin XRD (X Ray Diffraction), FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) ve SEM (scanning electron microscope) incelemeleri yapılmıştır

- **XRD (X Ray Diffraction) Analizi**

CNT-GB Kompozitinin XRD difraktogramı Şekil 6.48'de ve XRD verileri Tablo 6.8'de verilmiştir. Analiz edilen kompozit elektrot içeriği: CNT, CNT-GB, Ag₂S, Cu₂S, epoksi'dir.



Şekil 6. 48 CNT-GB kompozitinin XRD difraktogramı

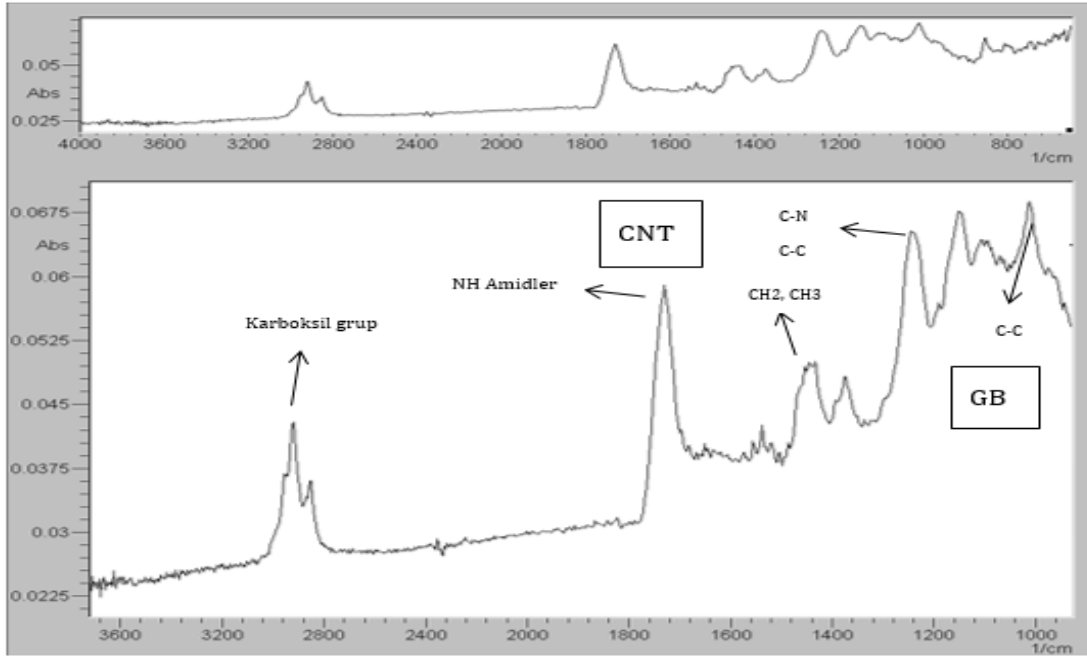
Tablo 6. 8 CNT-GB kompozitinin XRD verileri

Pos. [2θ]	Height [cts]	FWHM Left [2θ]	d-spacing [$\text{\AA}$]	Rel. Int. [%]
9.1595	2.91	1.0440	9.64726	6.49
14.3152	39.62	1.1520	6.18223	88.47
17.2832	24.34	1.1520	5.12668	54.34
18.8637	17.54	1.0800	4.70054	39.17
22.2053	31.77	0.0900	4.00015	70.93
26.6090	3.76	1.0080	3.34729	8.39
32.2947	0.64	1.0080	2.76978	1.42
43.1517	44.79	0.0900	2.09473	100.00
80.1757	1.63	1.0440	1.19619	3.63

Şekil 6.48'deki difraktogram referans makalelerde yer alan bilgilere göre yorumlanmıştır. (100-104)

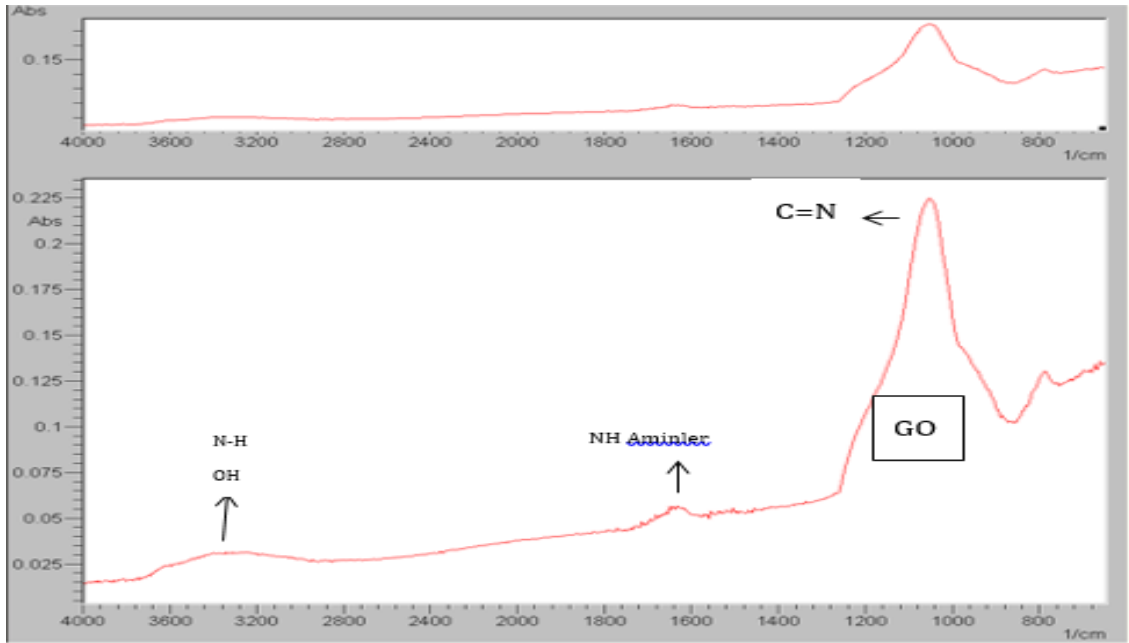
- **FTIR ANALİZİ**

Tüm FTIR analizleri farklı grupların yaklaşık infraed absorpsiyon frekans verilerine göre değerlendirilmiş ve şekil üzerinde işaretlenmiştir. CNT-GB Kompozit FTIR analizi Şekil 6.49'da verilmiştir.



Şekil 6. 49 CNT-GB kompozit FTIR analizi

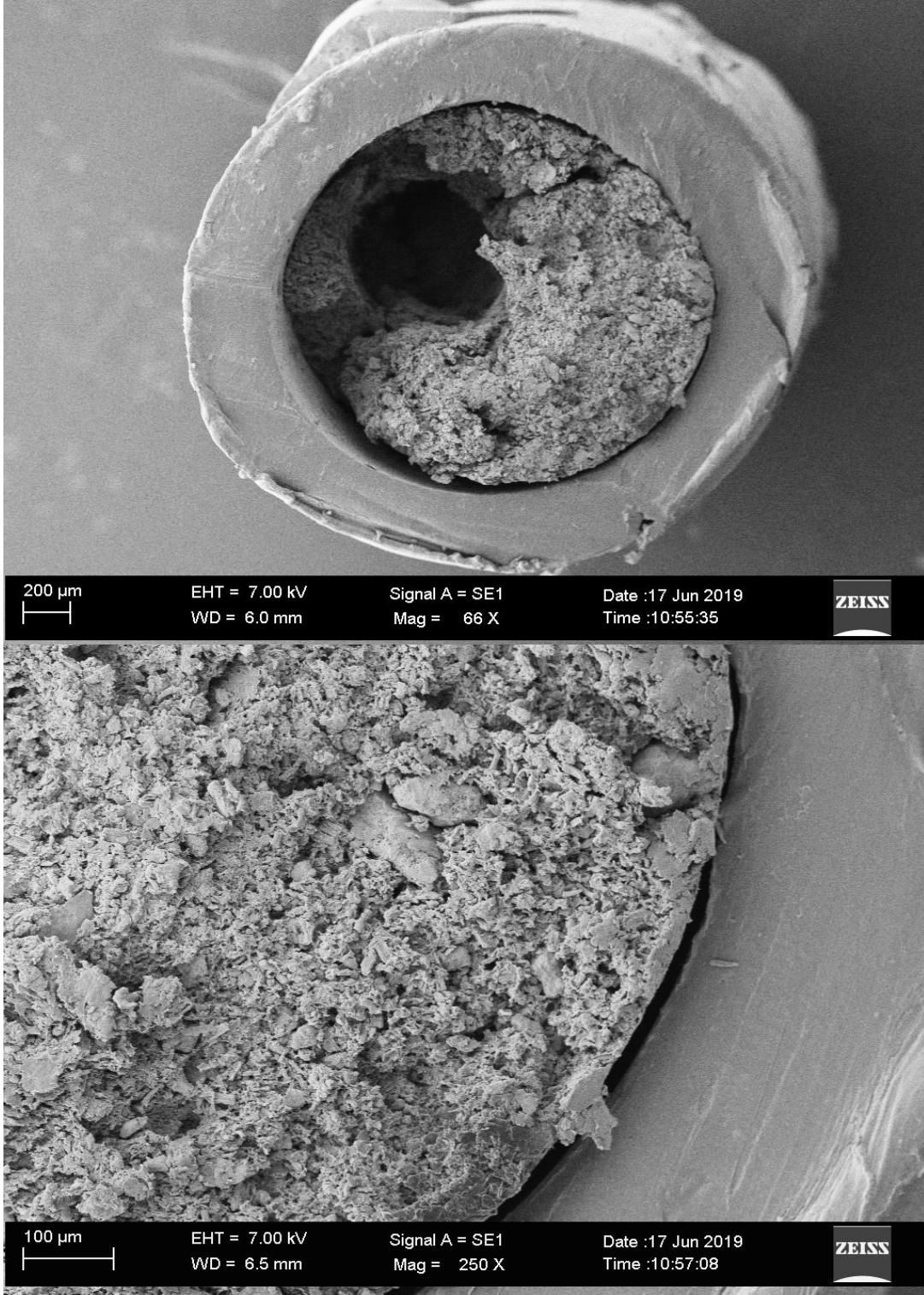
Kolon Dolgu Malzemesi FTIR Analizi Şekil 6.50’de verilmiştir. Kolon dolgu içeriği: grofit oksit, APBA (Aminofenil boronik asit), gluteraldehit (GA), karbodiimid/n-hidroksisüksinamid’dir.



Şekil 6. 50 Kolon dolgu malzemesi FTIR analizi

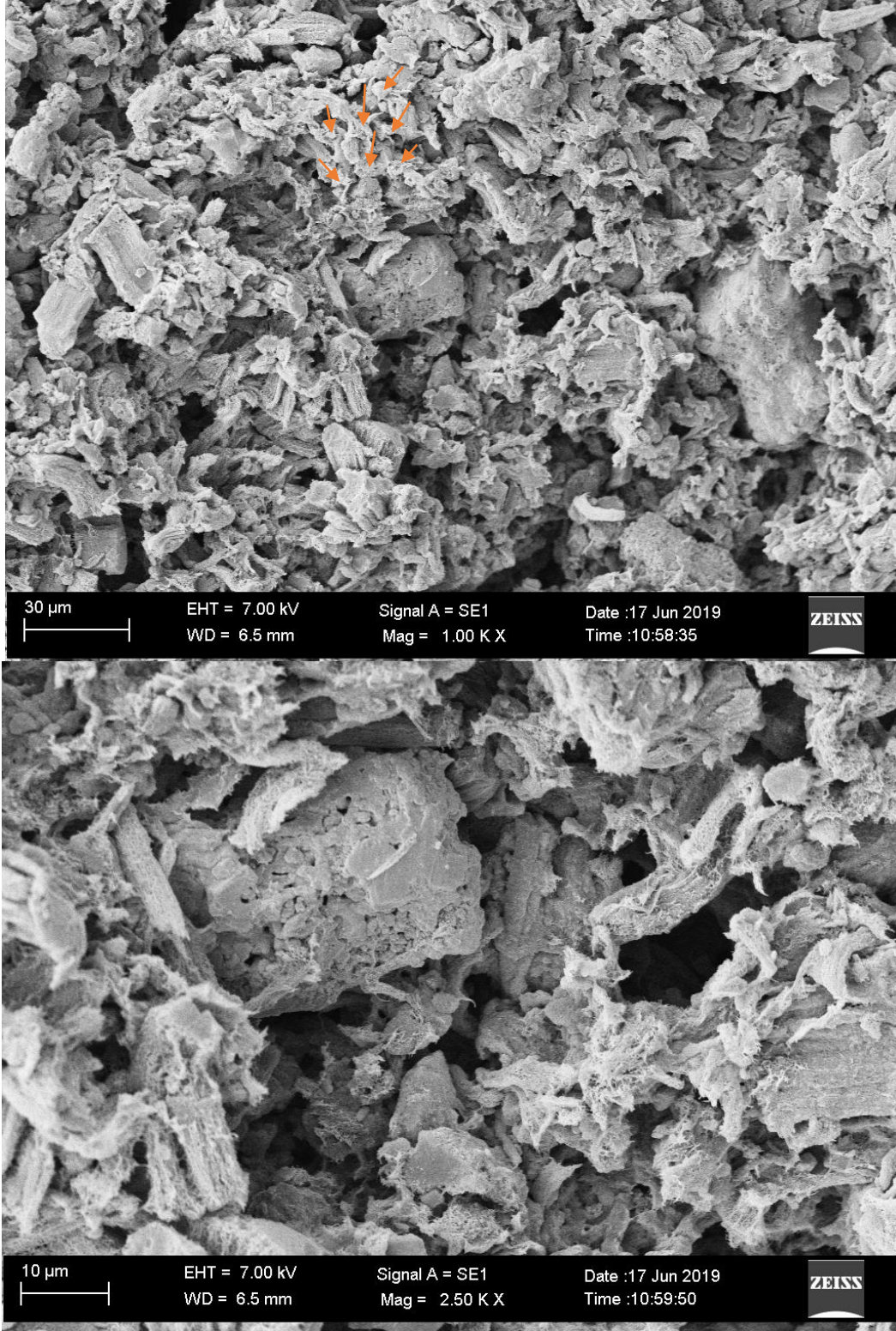
- SEM GÖRÜNTÜLERİ

CNT- GB Kompozitinin SEM Görüntüleri



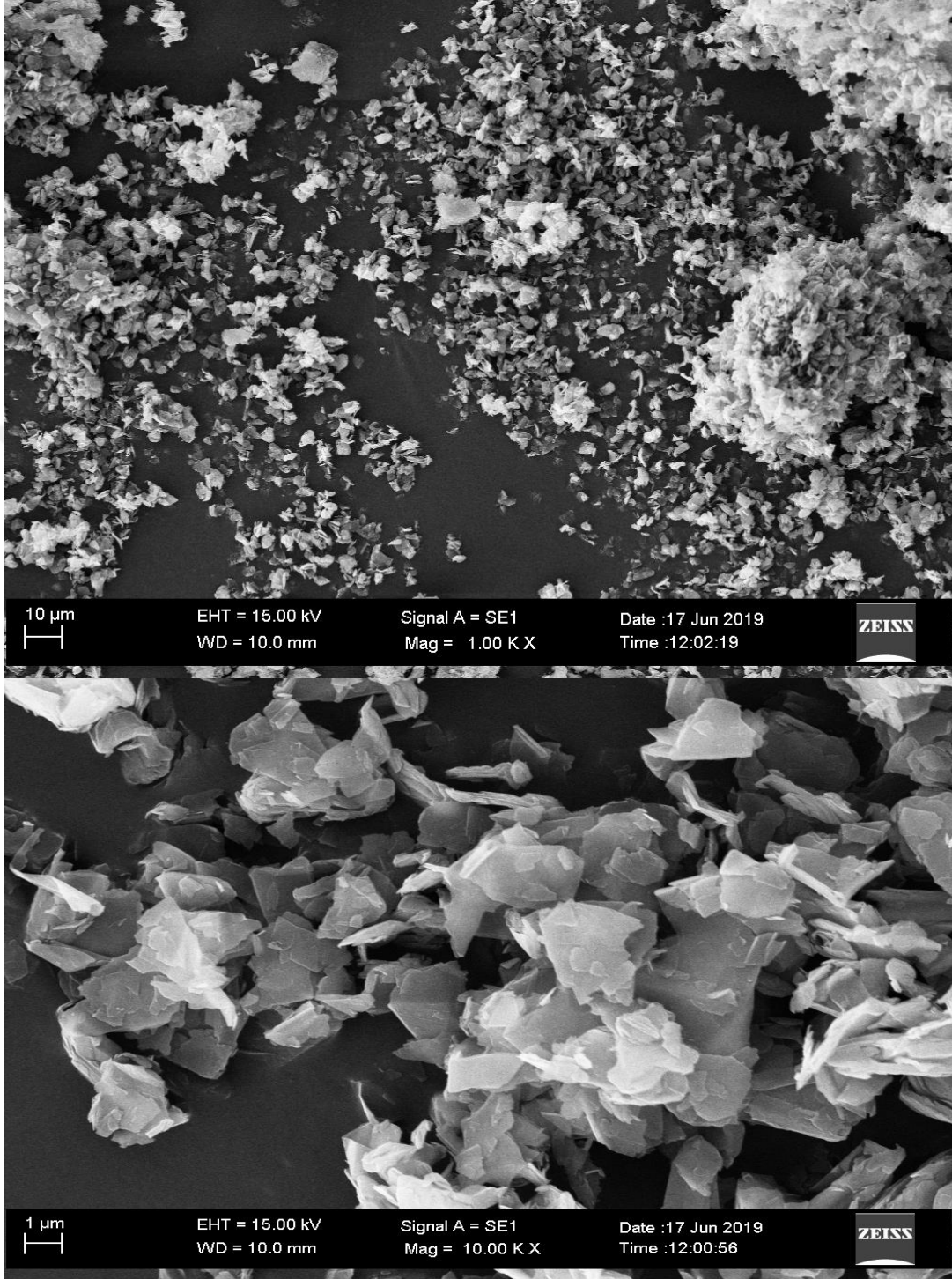
Şekil 6. 51 CNT-GB kompozit elektrotun SEM görüntüleri

CNT-GB kompozit elektrotun SEM görüntülerinden kompozit malzeme matrisinin homojen bir şekilde karıştırılmış olduğu görülmektedir.

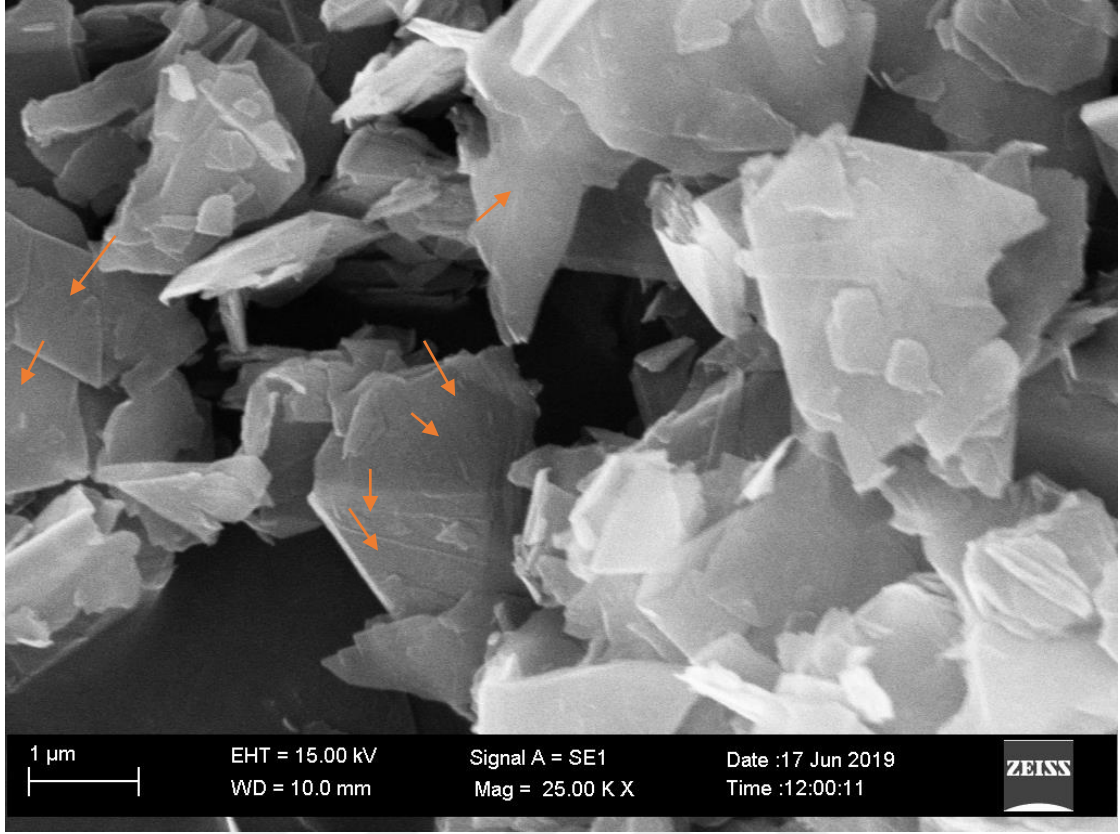


Şekil 6. 52 CNT-GB kompozit elektrotun SEM görüntüleri.

Şekil 6.52'deki CNT-GB kompozit elektrotun SEM görüntülerinde ok işareti ile gösterilen bölgelerde CNT-GB tutunduğu düşünülmektedir.



Şekil 6. 53 Kolon dolgu malzemesi SEM görüntüleri



Şekil 6. 54 Kolon dolgu malzemesi SEM görüntüsü

Şekil 6.54’de ok işaretleriyle belirlenen bölgelerde kolon dolgu malzemesinde tanecikler şeklinde aminofenil boronik asitin (APBA) tutunduğu ve yapının tamamına homojen dağıldığı düşünülmektedir.

Yapılan bu doktora tezi çalışmasında kandaki glikozu ve glikozile proteinleri tespit etmek için akış enjeksiyon sistemde dedektör olarak kullanılmak amacıyla CNT-gümüş borat bazlı iyon seçici kompozit elektrot geliştirilmiştir. Bu elektrotlar borun tetraborat formuna duyarlı olup seçici davranış sergilemektedirler.

CNT-gümüş borat bazlı iyon seçici kompozit elektrotların durgun ortamda sergilediği potansiyometrik performans özellikleri belirlendi. Optimum performansı gösteren elektrotların akış enjeksiyon analizi sistemlerinde dedektör olarak kullanımı, mikro hacime sahip akış hücreleri hazırlanarak test edildi. Mikro hacime sahip akış hücresi hazırlanarak akış enjeksiyon analiz sisteminde glikoz çözeltisinin yanı sıra standart HbA1c çözeltisi ve standart glikozile BSA çözeltisi analizi uygulamaları yapıldı. Geliştirilen CNT-GB-borat kompozit elektrotların durgun ortamda ve akış enjeksiyon analiz sistemlerinde yapılan analizler sonucu tekrarlanabilir sonuçlar verdiği gözlemlendi. Hareketli ortamlarda (akış enjeksiyon analiz sisteminde) geliştirdiğimiz CNT-GB bazlı iyon seçici kompozit elektrotun glikoza, g-HSA'ya ve HbA1c'ye potansiyometrik olarak yüksek oranda duyarlı olduğu tespit edildi. Üçlü ölçüm performansları hareketli ortamda enjeksiyonla ve durgun ortamda borat çözeltisine standart ilavesi yapılarak incelendi. Her iki yöntemden elde edilen sonuçlar birbiri ile tutarlılık sergilemekteydi.

Glikoz, HbA1c ve g-HSA'nın eş zamanlı ölçümünün yapılabilmesi için akış enjeksiyon sistemde kullanılmak üzere mini ayırım kolonu hazırlanarak glikoz, HbA1c ve g-HSA'nın ayrılabilirliği araştırıldı. GO-APBA temelli bir mini ayırım kolonu dolgu malzemesi sentezlendi. Sentezlenen dolgu malzemesi mini ayırım kolonuna doldurularak iki ucundan pamuk tıkaç ile kapatıldı ve hareketli faz akış yoluna entegre edildi. Geliştirilen ayırım kolonunun 30 µl/s akış hızında optimum ayırım sağladığı belirlendi. Bu ayırım glikoz, HbA1c ve g-HSA'nın CNT-GB bazlı elektrot ile eş zamanlı ölçümünün yapılabilirliğini göstermekteydi. Akabinde serum fizyolojik çözeltisine standart glikoz, HbA1c ve g-HSA eklenerek yapay kan benzeri bir çözelti

hazırlandı. Eş zamanlı ölçüm alınarak kalibrasyon grafiklerinden glikoz, HbA1c ve g-HSA konsantrasyon tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar glikoz ve glikozile proteinlerin serum fizyolojik çözeltide eşzamanlı ölçülebileceğini göstermektedir.

Elektrotların yüzeylerinden ince bir kesit alınmasıyla uzun bir süre kullanılabileceği gözlenmiştir. Ayrıca geliştirilen elektrotlar ekonomik olma, kolay hazırlama ve basit kullanım gibi önemli avantajlara da sahiptir.

Geliştirilen elektrotlar ile daha düşük seviyelerde tayin yapılabilmesi için elektrotların tayin limitlerinin düşük seviyelere çekilmesi ve cevap sürelerinin daha da kısaltılması önem arz etmektedir. Bu kapsamda elektrotların yapısında kullandığımız aktif materyallerin farklı kompozisyonlarda deneme çalışmalarının yapılması ve daha yüksek oranda basınç uygulanarak daha uzun süre kurutulması planlanmaktadır. Geliştirilen elektrotlar ile 1×10^{-5} M'dan daha düşük seviyelerde tayin yapılamamasını, elektrot yapısında aktif materyal olarak kullanılan gümüş borat tuzunun çözünmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bundan sonraki süreçte, eş zamanlı ölçümde daha hızlı ve etkin sonuç alabilmek için farklı kolon dolgu maddeleri sentezlenmesi önemli görülmektedir. Ayrıca potansiyometrik performans özellikleri belirlenen CNT-gümüş borat kompozit elektrotlar ile hasta kan örneklerinde glikoz, HbA1c ve g-HSA'nın direkt analizleri planlanmaktadır. Yapılacak bu analizlerden elde edilen sonuçların biyokimya laboratuvarlarından elde edilen sonuçlar ile kıyaslanarak sonuçların değerlendirilmesi, mevcut tez çalışmasının etkinliğini ortaya koymada yararlı olacaktır.

ÖNERİLER

- Tezde geliştirilen CNT-GB temelli elektrot kullanılarak hazırlanan akış enjeksiyon sistem ile kandaki diyabetik parametreler olan HbA1c, g-HSA ve glikozun eş zamanlı ölçümünün mümkün olduğu gösterilmiştir. Ancak eş zamanlı daha etkin bir ölçüm yapılabilmesi için daha etkili ayırım sağlayan yeni kolon dolgu malzemeleri geliştirilmelidir. Kolon dolgu malzemesinin daha küçük taneciklerle elde edilebilmesi için daha etkin bir yöntem ile

sentezlenerek grafit taneciklerine/nano tabakalara APBA daha iyi tutturulmalıdır.

- Daha hızlı ölçüm yapabilmek için elektrot duyarlılıklarının arttırılması, cevap sürelerinin kısaltılması gereklidir. Bunun için elektrot içeriği ve hazırlanma şekli geliştirilmelidir: Daha etkin kurutma, daha iyi sıkıştırma, daha iyi karıştırma vb.
- Farklı hareketli faz konsantrasyonları denenerek daha etkin sonuç alınması üzerine çalışmalar gereklidir. Hareketli faz akış hızı optimizasyonu üzerine çalışmalar genişletilebilir. HbA1c ve g-HSA için düzenli ve tekrarlı sinyal alınabilmesi için akış şartlarının (akış hızı, hareketli faz konsantrasyonu ve enjeksiyon hacmi ve konsantrasyonunun) çok dikkatli takip edilerek hassas bir şekilde ayarlanması gerekmektedir.
- Geliştirilen elektrot ile hasta kanı örneği ölçümü alınarak, mevcut biyokimya laboratuvar sonuçları kıyaslanıp ölçümün etkinliği değerlendirilmelidir.

- [1] Altınbaş, F., (2005). Kan ve Kan Bileşenlerinin Genel Özellikleri, Yoğun bakım Derneği Dergisi, Cilt:3, Sayı:2, 6-13.
- [2] Yetkin, İ., Kayahan, N., Satış, H.,(2015). Diyabet Komplikasyonlarının Gelişmesinde İyi Glisemik Kontrolün Önemi?, Türkiye Klinikleri J Endocrin-Special Topics 2015;8(1):17-21.
- [3] Gupta S., Jain U., Chauhan N., (2017). Laboratory Diagnosis of HbA1c: A Review. J Nanomed Res 5(4): 00120. DOI: 10.15406/jnmr.2017.05.00120.
- [4] T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Tıbbi Laboratuvar Kan Glikoz Analizleri, (2011). 725TTT110 Ankara.
- [5] Jeppsson, J-O., Kobold, U., Ban, J., (2002). Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. Clin Chem Lab Med 40: 78-89.
- [6] Kurt, İ., (2003). Glikozile Hemoglobin (HbA1c) Ölçümü Ve Diabetes Mellitusun Uzun Dönem Glisemik Kontrolünde Kullanılması, Gülhane Tıp Dergisi 45 (4) : 387-395.
- [7] Bunn, H.F., Haney, D.N., Gabbay, K.H., Gallop, P.M., (1975). Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A1c. Biochem. Biophys. Res. Commun., 67, 103-109.
- [8] Lin, H., Yi, J., (2017). Review, Current Status of HbA1c Biosensors, Sensors, 17, 1798; doi:10.3390/s17081798.
- [9] English, E., John, G., (2012). HbA1c (glycated haemoglobin) (blood), Association for Clinical Biochemistry.
- [10] Pohanka, M., (2009). Monoclonal and polyclonal antibodies production preparation of potent biorecognition element. Journal of Applied Biomedicine (De Gruyter Open) 7(3): 115-121.
- [11] Taslıpınar, A., HbA1c herkes için kullanılabilir mi?, GATA Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları BD Ankara.
- [12] Wu X., Monnier VM., (2003). Enzymatic deglycation of proteins. Arch Biochem Biophys 419(1): 16-24.

- [13] Szwergold BS., Howell S., Beisswenger PJ., (2001). Human fructosamine- 3-kinase: purification, sequencing, substrate specificity, and evidence of activity in vivo. *Diabetes* 50(9): 2139-2147.
- [14] Szwergold BS., Howell SK., Beisswenger PJ., (2005). Transglycation-a potential new mechanism for deglycation of Schiff's bases. *Ann NY Acad Sci* 1043: 845-864.
- [15] Luthra M., Balasubramanian D., (1993). Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins *J Biol Chem* 268(24): 18119-18127.
- [16] Tübitak Bor Raporu, (2003). http://tubitak.gov.tr/tubitak_content_files/vizyon2023/mm/Ek2h.pdf, erişim tarihi: 15.02.2019.
- [17] DPT (2001)., Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Endüstriyel Hammaddeler Alt Komisyonu Kimya Sanayii Hammaddeleri Cilt II, Bor Tuzları-Trona-Kaya Tuzu-Sodyum Sülfat-Stronsiyum, Çalışma Grubu Raporu.
- [18] Borat 2D Moleküler Görünümü <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=9855541&width=500&height=500> 20.01.2019.
- [19] Dell, A., Morris, H.R. (2001). Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science*, 291, 2351–2356.
- [20] Nagae, M., Yamaguchi, Y., (2012). Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 8398–8429.21.
- [21] Wang, X., Xia, N., Liu, L., (2013). *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 20890-20912; doi:10.3390/ijms141020890.
- [22] Ashwood, B., (2005). *Tietz Textbook Of Clinical Chemistry 4th Edition By burtis Hardcover.*
- [23] Tanaka, T., Matsunaga, T., (2001). Detection of HbA(1c) by boronate affinity immunoassay using bacterial magnetic particles. *Biosens. Bioelectron.* 16, 1089–1094.
- [24] Koskinen, L.K., (1996). Specificity of hemoglobin A1c measurement by cation exchange liquid chromatography. Evaluation of a Mono S column method. *Clin. Chim. Acta*, 253, 159–169.
- [25] Li, Y., Jeppsson, J.-O., Jornten-Karlsson, M., Larsson, E.L., Jungvid, H., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Application of shielding boronate affinity chromatography

in the study of the glycation pattern of haemoglobin. *J. Chromatogr. B* 2002, 776, 149–160.».

- [26] Koval, D., Kasicka, V., Cottet, H. (2011). Analysis of glycated hemoglobin A1c by capillary electrophoresis and capillary isoelectric focusing. *Anal. Biochem.*, 413, 8–15.
- [27] Marinova, M., Altinier, S., Caldini, A., Passerini, G., Pizzagalli, G., Brogi, M., Zaninotto, M., Ceriotti, F., Plebani, M. (2013). Multicenter evaluation of hemoglobin A1c assay on capillary electrophoresis. *Clin. Chim. Acta* 424, 207–211.
- [28] Parker, K.M., England, J.D., Costa, J.D., Hess, R.L., and Goldstein, D.E. (1981). Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin. *Clin. Chem.*, 2715, 669–672.
- [29] Schnedl, W.J., Krause, R., Halwachs-Baumann, G., Trinker, M., Lipp, R.W., Krejs, G.J., (2000). Evaluation of HbA1c determination methods in patients with hemoglobinopathies. *Diabetes Care*, 23, 339–344.
- [30] Boonyasit, Y., Laiwattanapaisa, W., Chailapakul, O., Emneus, J., Heiskanen, A.R. (2016). Boronate-modified interdigitated electrode array for selective impedance-based sensing of glycated hemoglobin. *Anal. Chem.*, 88, 9582–9589.
- [31] Halánek, J., Wollenberger, U., Stöcklein, W., Scheller, F.W. (2007). Development of a biosensor for glycated hemoglobin. *Electrochim. Acta*, 53, 1127–1133.
- [32] Liu, A., Xu, S.R., Deng, H.Y., Wang, X.C. (2016). A new electrochemical HbA1c biosensor based on flow injection and screen-printed electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 11, 3086–3094.
- [33] Park, J.Y., Chang, B.Y., Nam, H., Park, S.M. (2008). Selective electrochemical sensing of glycated hemoglobin (HbA(1c)) on thiophene-3-boronic acid self-assembled monolayer covered gold electrodes. *Anal. Chem.*, 80, 8035–8044.
- [34] Hsieh, K.M., Lan, K.C., Hu, W.L., Chen, M.K., Jang, L.S., Wang, M.H., (2013). Glycated hemoglobin (HbA1c) affinity biosensors with ring-shaped interdigital electrodes on impedance measurement. *Biosens. Bioelectron.* 49, 450–456.
- [35] Chuang, Y.-C., Lan, K.-C., Hsieh, K.-M., Jang, L.-S., Chen, M.-K. (2012). Detection of glycated hemoglobin (HbA1c) based on impedance measurement with parallel electrodes integrated into a microfluidic device. *Sens. Actuators B Chem.*, 171–172, 1222–1230.

- [36] Krishna, S.R., Bhat, N., Amrutur, B. (2011). Detection of glycated hemoglobin using 3-aminophenylboronic acid modified graphene oxide. In Proceeding of the IEEE/NIH Life Science Systems and Applications Workshop (LiSSA), Bethesda, MD, USA, 7–8 April.
- [37] Boonyasit, Y., Heiskanen, A., Chailapakul, O., Laiwattanapaisal, W. (2015). Selective label-free electrochemical impedance measurement of glycated haemoglobin on 3-aminophenylboronic acid-modified eggshell membranes. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407, 5287–5297.
- [38] Kim, D.M., Shim, Y.B. Disposable amperometric glycated hemoglobin sensor for the finger prick blood test. *Anal. Chem.* 2013, 85, 6536–6543.
- [39] Song, S.Y., Han, Y.D., Park, Y.M., Jeong, C.Y., Yang, Y.J., Kim, M.S., Ku, Y., Yoon, H.C. Bioelectrocatalytic detection of glycated hemoglobin (HbA1c) based on the competitive binding of target and signaling glycoproteins to a boronate-modified surface. *Biosens. Bioelectron.* 2012, 35, 355–362.
- [40] Song, S.Y., Yoon, H.C. Boronic acid-modified thin film interface for specific binding of glycated hemoglobin (HbA1c) and electrochemical biosensing. *Sens. Actuators B Chem.* 2009, 140, 233–239.
- [41] Halámek, J., Wollenberger, U., Stöcklein, W.F.M., Warsinke, A., Scheller, F.W. Signal amplification in immunoassays using labeling via boronic acid binding to the sugar moiety of immunoglobulin g: Proof of concept for glycated hemoglobin. *Anal. Lett.* 2007.
- [42] Stöllner, D., Stöcklein, W., Scheller, F., Warsinke, A., (2002). Membrane-immobilized haptoglobin as affinity matrix for a hemoglobin-a1c immunosensor. *Anal. Chim. Acta*, 470, 111–119.
- [43] Stöllner, D., Warsinke, A., Stöcklein, W., Dölling, R., Scheller, F. (2001). Immunochemical determination of hemoglobin-A1c utilizing a glycated peptide as hemoglobin-A1c analogon. *Biosens. Symposium Tubingen*.
- [44] Molazemhosseini, A., Magagnin, L., Vena, P., Liu, C.C. (2016). Single-use disposable electrochemical label-free immunosensor for detection of glycated hemoglobin (HbA1c) using differential pulse voltammetry (DPV). *Sensors*, 16, 1024.
- [45] Ogawa, K.; Stollner, D.; Scheller, F.; Warsinke, A.; Ishimura, F.; Tsugawa, W.; Ferri, S.; Sode, K. (2002). Development of a flow-injection analysis (FIA) enzyme sensor for fructosyl amine monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, 211–214.

- [46] Fang, L., Li, W., Zhou, Y., Liu, C.C. (2009). A single-use, disposable iridium-modified electrochemical biosensor for fructosyl valine for the glycosylated hemoglobin detection. *Sens. Actuators B Chem.*, 137, 235–238.
- [47] Chawla, S., Pundir, C.S. (2011). An electrochemical biosensor for fructosyl valine for glycosylated hemoglobin detection based on core-shell magnetic bionanoparticles modified gold electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 26, 3438–3443.
- [48] Chawla, S., Pundir, C.S. (2012). An amperometric hemoglobin A1c biosensor based on immobilization of fructosyl amino acid oxidase onto zinc oxide nanoparticles-polypyrrole film. *Anal. Biochem.*, 430, 156–162.
- [49] Jain, U.; Chauhan, N. (2017). Glycated hemoglobin detection with electrochemical sensing amplified by gold nanoparticles embedded N-doped graphene nanosheet. *Biosens. Bioelectron.*, 89, 578–584.
- [50] Sode, K., Takahashi, Y., Ohta, S., Tsugawa, W., Yamazaki, T. (2001). A new concept for the construction of an artificial dehydrogenase for fructosylamine compounds and its application for an amperometric fructosylamine sensor. *Anal. Chim. Acta*, 435, 151–156.
- [51] Sode, K.; Ohta, S.; Yanai, Y.; Yamazaki, T. (2003). Construction of a molecular imprinting catalyst using target analogue template and its application for an amperometric fructosylamine sensor. *Biosens. Bioelectron.*, 18, 1485–1490.
- [52] Chien, H.-C.; Chou, T.-C. (2011). A nonenzymatic amperometric method for fructosyl-valine sensing using ferroceneboronic acid. *Electroanalysis*, 23, 402–408.
- [53] Weykamp, C., (2013). HbA1c: A Review of Analytical and Clinical Aspects, *Ann Lab Med*. Nov;33(6):393-400.
- [54] Hamwi A, Schweiger CR, Veitl M, Schmid R (1995). Quantitative measurement of HbA1c by an immunoturbidimetric assay compared to a standard HPLC method. *Am J Clin Pathol* 104(1): 89-95.
- [55] Camargo JL, Gross JL., (2004). Conditions associated with very low values of glycohaemoglobin measured by an HPLC method. *J Clin Pathol* 57(9): 346-349.
- [56] Owen, M., (2015). The glucose vs. HbA1c controversy. Canterbury Scientific, New Zealand.

- [57] Jaisson S, Desmons A, Renard B, Chevelle B, Leroy N, et al., (2014). Analytical performances of a new enzymatic assay for hemoglobin A1c. Clin Chim Acta 434(1): 48-52.
- [58] Stephen DS, Edwin GM., (1981). Reagent and test kit for determining glycosylated hemoglobin.
- [59] Liu L, Hood S, Wang Y, Bezverkov R, Dou C, et al. (2008). Direct enzymatic assay for %HbA1c in human whole blood samples. Clin Biochem 41(7-8): 576-583.
- [60] Kurt, İ., Kutluay. T., Karaca, L., (1993). Klinik Biyokimya analitik gözden geçirme: Serum glikozile protein ölçüm yöntemleri. Biyokimya Dergisi 18: 109-138.
- [61] National Glycohemoglobin Standardization Program <http://www.ngsp.org/index.asp>, 24.01.2019.
- [62] Little, R.R., Rohlfing, C.L., Wiedmeyer, H-M., Myers, G.L., Sacks. D.B., Goldstein. D.E.: (2001). The national glycohemoglobin standardization program(NGSP): a five-year progress report. Clin Chem 47: 1985-1992.
- [63] Goodall, I., (2005). HbA1c standardisation destination—Global IFCC standardisation. How, why, where and when—A tortuous pathway from kit manufacturers, via inter-laboratory lyophilized and whole blood comparisons to designated national comparison schemes. Clin. Biochem. Rev., 26, 5–19.
- [64] Ang, S.H.; Thevarajah, M.; Alias, Y.; Khor, S.M. (2015). Current aspects in hemoglobin A1c detection: A review. Clin. Chim. Acta, 439, 202–211.
- [65] Farklı Kuruluşlara Göre HbA1c'nin Diyabetik Üst Sınır Değerleri, <http://www.ngsp.org/convert1.asp> Erişim tarihi: 01.02.2019.
- [66] HbA1c 'nin IFCC Standardizasyonu <http://www.ngsp.org/index.asp> Erişim Tarihi: 01.02.2019.
- [67] Erdem, K.A., (1996). Elektrokimyasal Sensörlerin Tasarımı ve Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [68] Göneş, A., (2017). Süt Endüstrisinde Gıda Güvenliği Ve Kalitesinin Arttırılması Amacıyla Ph, Toplam Asitide Ve Yağ Miktarının Hızlı Ve Ekonomik Tayini İçin Otoanalizör Cihaz Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- [69] Skoog D. A., West D. M. and Holler F. J., (1996). Fundamentals of Analytical Chemistry, 7th Edition, Saunders College Publishing, Rinehart and Winston Inc. USA.
- [70] Topcu C., (2013). Bor Seçici Elektrot Geliştirilmesi, Toprak Ve Su Numunelerinde Bor Ölçümü İçin Uygulanması, Doktora Tezi, T.C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [71] Covington A. K., (1974). Ion-Selective Elektrodes, Anal. Chem., CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry, 355-406.
- [72] Suzuki K., Tohda K. and Shirai T., (1987). Response Amplification of an IonSelective Electrode, Anal. Lett., 20(11), 1773-1779.
- [73] Skoog, D.A. ve West, D.M., (1991). Fundamentals of Analytical Chemistry, Seventh Edition, Saunders College Publishing, Florida.
- [74] International Journal Of Applied Research In Science And Engineering ISSN (Online): 2456-124X International Conference on Emerging Technologies in Engineering, Biomedical, Medical and Science (ETEBMS - November 2016).
- [75] Ion-Selective Electrodes, http://www.cffet.net/sia-e/3_ISEs.pdf, erişim tarihi: 14/05/19.
- [76] Umezawa Y., Bühlmann P., Umezawa K., Tohda K., And Amemiya S., (2000). Potentiometric Selectivity Coefficients Of Ion-Selective Electrodes, Pure Appl. Chem., 72, 1851-2082.
- [77] Güneş, B., (2004). Bazı İyon-Seçici Elektrotlarda Seçicilik Katsayıları Tayin Metotlarının Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- [78] Buck P.R., Lindner E., (1994). Recommendations For Nomenclature Of Ion-Selective Electrodes, Pure &App/. Chem., 66, 2527-2536.
- [79] Coldur F., Andac M., Isildak I., Saka T., (2008). A micro-sized PVC membrane Li⁺-selective electrode without internal filling solution and its medical applications, Journal of Electroanalytical Chemistry , 626(1-2), 30-35.
- [80] Erdem A., Özkan D., Kerman K., Meriç B., Dalbastı T., Özsöz, M., (2000). Ion Selective Membrane Electrode for the Determination of a Novel Phenylpiperazine Antidepressant, Nefazodone, Turk J Chem., 24, 353-360.
- [81] Fogg A. G., Pathan A. S., Thorburn Burns E. D., (1974). A Liquid-State Tetrafluoroborate Ion -Selective Electrode Based on Brilliant Green Tetrafluoroborate, Analytical Letters, 7, 545-551.

- [82] Isildak I. and Covington A. K., (1993). Ion-Selective Electrode Potentiometric Detection in Ion-Chromatography, *Electroanalysis*, 5, 815-824.
- [83] Durmaz, F., (2008). Akış Enjeksiyon – Katı Faz Ekstraksiyon Sistemi İle Bazı Metal İyonlarının Tayin Edilmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı, Konya.
- [84] Ruzicka J., Hansen, E.H., (1975). Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Anal. Chim. Acta*, 78 145.
- [85] Krug, F.J., Ruzicka, J., Hansen, E.H., (1979). Determination of ammonia in low concentrations with Nessler's reagent by flow injection analysis, *Analyst*, 104 47. 9.
- [86] Ruzicka J., Stewart J.W.B., (1975). Flow Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, 79 79.
- [87] Lukkari, I., (1996). Flow Injection Systems for Process Analytical Chemistry, Umea Univeristet, Akademisk Avhandling, ISBN 91-7191-130-8, Sweden.
- [88] Kuşçu, M., (2008). Akış-Enjeksiyon Analizi İle Su Numunelerinden Kurşunun Giderilmesi Ve Önzenginleştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne.
- [89] Kikas, K., Introduction to Flow Injection Analysis (FIA) ,Determination of Chloride Ion Concentration, www2.chemistry.gatech.edu/class/analyt/fia.pdf, Erişim tarihi: 16.05.2019.
- [90] McKelvie, J., (2008). Comprehensive Analytical Chemistry, Volume 54, Pages 81-109.
- [91] Ruzicka, J., Hansen, E., H., (1998). Flow Injection Analysis-Second Edition- A Wiley Interscience Publication, USA.
- [92] Skoog A. D., Holler F. J., Nicman A. T., (1998). Enstrümental Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- [93] Gündüz T., (2002). İnstrümental Analiz, Gazi Kitabevi, Ankara.
- [94] Valcarcel M. and Luque De Castro M.D., (1987). Flow Injection Analysis Principles and Applications, Ellis Horwood Limited, England.
- [95] Fang, Z., (1995). 'Flow Injection Atomic Absorption Spectrometry', 59.

- [96] Sanz-Medel A., (1999). Flow Analysis with Atomic Spectrometric Detectors, 13-33.
- [97] Ruzicka, J., Scampavia, L., (1999). From Flow Injection to Bead Injection, Analytical Chemistry News & Features April 1,; pp. 257A-263A.
- [98] Guerin-Dubourg A, Catan A., Bourdon E., Rondeau P. (2012). Structural modifications of human albumin in diabetes. Diabetes and Metabolism. 38: 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2011.11.002> PMID: 22349032.
- [99] IUPAC, Response time, <https://goldbook.iupac.org/terms/view/R05345>, Erişim Tarihi: 31.07.2019.
- [100] Shamraiz, U., Badshah, A., Azadar, R., Amtiaz, H., Nadeem, Saba, S., (2017). Surfactant free fabrication of copper sulphide (CuS–Cu₂S) nanoparticles from single source precursor for photocatalytic applications, Journal of Saudi Chemical Society, Volume 21, Issue 4, Pages 390-398 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610315000939> .
- [101] Huang, N., Zang, J., Zhang, G., Guan, L., Li, S., , Li Zhao, Tang, L., (2017). Efficient interfacial interaction for improving mechanical properties of polydimethylsiloxane nanocomposites filled with low content of graphene oxide nanoribbons, Royal Society of Chemistry.
- [102] Wagh, R., Salunke, D. B., Gosavi, S. R., Patil, R. S. , (2016). Effect of Uniform Decoration of Ag₂S Nanoparticles on Physical Properties of Granular TiO₂ Thin Films Synthesized by Using Spin Coating Technique.
- [103] Ağuş, O., Abalı, Y., Arslan, O., Keskin, N., Facile And Controlled Production Of Silver Borate Nanoparticles, <https://link.springer.com/article/10.1007/s42452-019-0686-y>, Erişim tarihi: 13 Nisan 2019.
- [104] Abdullah, S., Mechanical Properties of Graphene oxide/EPOKSİ Composite, Proceedings National Graduate Conference 2012.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: duygu.uner1@gmail.com

Makaleler

1. ÜNER-BAHAR, D., TOPÇU, C., ÖZÇİMEN, D., IŞILDAK, İ., (2019). *A Novel Borate-Selective Composite Membrane Electrode Based On Carbon Nanotube-Silver Borate*, International Journal of Electrochemical Science.

Konferans Bildirileri

1. **Tam bildiri metni:** IŞILDAK, İ., ÜNER-BAHAR, D., Tanyeri, Y., (2018). Development of Borate Electrode for the Measurement of Glycosylated Proteins, Journal of Molecular Biology and Biotechnology.

2. **Sözlü bildiri:** ÜNER-BAHAR, D., (2018).Glikozillenmiş Proteinlerin Ölçümleri İçin Borat Elektrot Geliştirilmesi, 7. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Suhan Kapadokya Hotel Nevşehir.

3. **Poster Bildiri:** TANYERİ, Y., ÜNER-BAHAR, D., IŞILDAK, İ., (2018). Akış Enjeksiyon Sisteminde Glikolize Protein Tayini İçin Borat Seçici Elektrot Geliştirilmesi,9. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Nov Hotel, Konya.

4. **Poster Bildiri:** ÜNER-BAHAR, D., IŞILDAK, İ., (2019). Determination of Standard Glycosylated Proteins using Borate Selective Electrode as a Dedector in FIA System, 1st International congress on analytical and bioanalytical chemistry, IC Santai Family Resort, Antalya.

Projeler

Bu doktora tezi Tubitak 1001 116S758 nolu proje ve 2211C Öncelikli alanlar doktora bursu ile desteklenmiştir.