

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AMPEROMETRİK FENOL BİYOSENSÖRLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Çevre Yük. Müh. M. Mevra YALVAÇ

**FBE Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında
Hazırlanan**

DOKTORA TEZİ

Tez Savunma Tarihi : 25 Ocak 2010

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ferruh ERTÜRK (YTÜ)

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Bülent KESKİNLER (GYTE)

: Prof. Dr. Ahmet DEMİR (YTÜ)

: Prof.Dr. Cumali KINACI (İTÜ)

: Prof.Dr. Dilek KAZAN (MÜ)

İSTANBUL, 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖNSÖZ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. BİYOSENSÖRLER.....	5
2.1 Güç Çeviriciler	7
2.1.1 Elektrokimyasal Güç Çeviriciler	7
2.1.1.1 Amperometrik Biyosensörler	7
2.1.1.2 Potansiyometrik Güç Çeviriciler	10
2.1.1.3 İyona Duyarlı Alan-Etkili Transistörler (ISFET)	10
2.1.1.4 İletkenlik Sensörleri.....	10
2.1.1.5 Empedans Sensörler	11
2.1.1.6 Kronoamperometrik Sensörler	11
2.2 Biyosensörlerin Çalışma Prensipleri.....	12
2.2.1 Enzim İmmobilizasyon Metotları	13
2.2.1.1 Fiziksel Tutuklama	13
2.2.1.2 Kimyasal Tutuklama.....	14
2.2.1.2.1 Fonksiyonel Maddelerle Çapraz Bağlama.....	14
2.2.2 Elektrokimyasal Sensörler	15
2.2.2.1 Potansiyometrik Sensörler	15
2.2.2.2 Amperometrik Sensörler.....	16
2.2.3 Biyosensörde Ölçüm Metodu İçin Gerekli Analitik Hesaplamalar	17
2.2.3.1 Kalibrasyon Eğrisinin Lineerliği	17
2.2.3.2 Cevap Süresi	17
2.2.3.3 Ölçüm Metodunun Güvenilirliği	17
2.2.3.4 Belirleme Limiti	18
2.2.3.5 Hassasiyet	18
3. BİYOSENSÖR UYGULAMALARINDA KULLANILAN YENİ ELEKTROT MATERYALLERİ	19
3.1 İletken Polimerlerin Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı	19
3.2 Karbon Nanotüp ve Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı.....	25

4.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
4.1	Kimyasal Ve Aparatlar	30
4.2	DeneySEL DÜZENEKLER	30
4.2.1	Sürekli Sistem Deney Düzenegi	30
4.2.2	Kesikli Sistem Deney Düzenegi	31
4.3	Çalışma Elektrotlarının Hazırlanması	32
4.3.1	Sürekli Sistem için Polipirol / Poligluteralehit / Tyrosinaz /CNT/ Cam karbon (PPy/PGA/Tyr/CNT/GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	32
4.3.2	Sürekli Sistem için Polipirol / Poligluteralehit / Tyrosinaz / Cam karbon (PPy/PGA/Tyr/GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	34
4.3.3	Kesikli Sistemde Karbodiimid Bağlama Metodu İle Elektrotların Hazırlanması	34
4.3.3.1	Polipirol / Karbon nanotüp /Karbodiimid/ Tyrosinaz / Cam karbon (PPy / CNT /karbodiimid/ Tyr / GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	34
4.3.3.2	Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate/ Polipirol/ Karbon nanotüp/ Karbodiimid/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/karbodiimid/Tyr/GC} Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	35
4.3.3.3	Polipirol / Karbodiimid/ Tyrosinaz / Cam karbon (PPy / karbodiimid/ Tyr / GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	36
4.3.3.4	Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate / Polipirol / Karbodiimid/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/karbodiimid/Tyr/GC} Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	36
4.3.4	Direkt Bağlama Metodu ile Kesikli Sistem için Elektrotların Hazırlanışı	37
4.3.4.1	Polipirol / Karbon nanotüp/ Tyrosinaz/ Cam karbon (PPy / CNT / Tyr / GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	37
4.3.4.2	Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate/ Polipirol/ Karbon nanotüp/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC} Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	37
5.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	38
5.1	Polipirol / Karbon nanotüp / Tyrosinaz / Cam karbon (PPy / PGA./CNT / Tyr / GC) Sürekli Sistem Çalışma Elektrodu Bulguları	38
5.2	Polipirol / Tyrosinaz / Cam karbon (PPy/PGA/Tyr/GC) Sürekli Sistem Çalışma Elektrotu Bulguları	42
5.3	Karbodiimid Bağlama Metodu ile Hazırlanan Kesikli Çalışma Elektrotu Bulguları47	
5.3.1	Polipirol / Karbon nanotüp /Karbodiimid/ Tyrosinaz / Cam karbon (PPy / CNT /karbodiimid/ Tyr / GC) Kesikli Çalışma Elektrot Bulguları	47
5.3.2	Polipirol /Karbodiimid/Tyrosinaz (PPy/Tyr/GC) Çalışma Elektrodu Bulguları ...	56
5.3.3	Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate / Polipirol / Karbon nanotüp/ Karbodiimid/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC} Çalışma Elektrodu Bulguları	64
5.3.4	Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate / Polipirol / Karbodiimid/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC} Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	73
5.4	Direkt Bağlama Metodu ile Hazırlanan Elektrot Bulguları.....	81
5.4.1	Polipirol / Karbon nanotüp/ Tyrosinaz/ Cam karbon (PPy / CNT / Tyr / GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	81
5.4.2	Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate/ Polipirol/ Karbon nanotüp/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC} Çalışma Elektrotunun Hazırlanması	90
5.5	Çalışılan Fenolik Türlerin Gaz Kromatografında (GC-MS) Ölçümleri	99

6.	SONUÇLAR.....	102
	KAYNAKLAR.....	106
	EK-1	110
	ÖZGEÇMİŞ.....	111

SİMGE LİSTESİ

a_i	çözünmüş çözeltilerin konsantrasyonu
$k_{i,j}^{pot}$	potansiyometrik seçicilik katsayısı
E	Elektrot potansiyeli
E^0	Standart elektrot potansiyeli
R	İdeal gaz sabiti
T	Sıcaklık
n	Mol sayısı
F	Faraday sabiti
Z_s	İmpedans
R_s	Resistansta oluşan seri
C_s	Kapasite
i	Kompleks alandaki biri
ω	Frekans
t	Sıcaklık
Q	Özgül Isı
M	Sıvı Kütlesi
c_p	Çözeltinin Termal Kütle Kapasitesi
K_m	Michelis-Menten Sabiti
s_b	Standart Sapma
m	Kalibrasyon Eğrisinin Eğimi

KISALTMA LİSTESİ

HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografi
CE	Elektrokimyasal Kapiler Elektroforez
GC-MS	Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometri Metodu
UV	Ultra Viyole
MIP-ES	Mikrodalga İndüklenmiş Plazma Emisyon Spektroskopisi
EPA	Environmental Protection Agency
CPE	Carbon Paste Electrode(karbon hamuru)
ISFET	İyon Değiştiricili Alan Etkili transistörler
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
EPR	Elektron Paramanyetik Rezonans
PVC	Polivinilklorür
PPS	Poli Fenilin Sülfat
PPy	Polipirol
CNT	Karbon Nanotüp
SWCNT	Tek Duvarlı Karbon Nanotüp
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
PGA	Poligluteralehid
Tyr	Tyrosinaz Enzimi
GC	Glassy Carbon Electrode (Camımsı Karbon Elektrot)
CV	Cyclic Voltammetry (Dönüşümlü Voltametri)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
MTM	3-thienylmethacrylate
GMA	Glisin Metakrilat
DMF	Dimetil formamid
AIBN	2, 2'-Azodiiizobütironitril
THF	Tiyofen
LOD	Belirleme Limiti
RSD	Relatif Standart Sapma

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Biyosensör ve ana elamanları.....	5
Şekil 2.2 Potansiyometrik gaz probu.....	16
Şekil 3.1 Biyosensörlerde kullanılan bazı iletken polimerlerin yapıları (Gerard, M.,2002) ...	24
Şekil 3.2 Tek duvarlı karbonanotüp (SWCNT) yapısı	26
Şekil.3.3 Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) yapısı	27
Şekil 3.4 C60 molekülünün şematik gösterimi.....	29
Şekil 4.1 Sürekli sistem deney düzeneği	31
Şekil 4.2 Sürekli sistem deney düzeneği	32
Şekil 4.3 Pirelün polimerizasyonu için hazırlanan reaksiyon ortamı.....	32
Şekil 4.4 Polipirol kaplanmış sürekli sistem cam karbon elektrot yüzeyinde enzim immobilizasyonu.....	33
Şekil 4.5 Poli(GMA-co-MTM)'nin sentezi	35
Şekil 5.1 PPy / CNT / Tyr / GC çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği (tarama hızı 100 mVs-1)	38
Şekil 5.2 0,1 mL/dak (a), 0,25 mL/dak (b), 0,5 mL/dak (c), 1 mL/dak (d), 2 mL/dak (e), 4 mL/dak (f), 6 mL/dak (g) akış hızlarında katekol enjeksiyonlarından elde edilen pik oluşumları.....	39
Şekil 5.3 0.003mM (a), 0.005mM (b), 0.0075mM (c), 0.01mM (d), 0.02mM (e), 0.03mM (f), 0.05mM (g), 0.1mM (h), 0.2mM (i), 0.3mM (j), 0.5mM (k), 1mM (l), 2mM (m), 3mM (n), 5mM (o) katekol enjeksiyonları sonucu elde edilen pik oluşumları	40
Şekil 5.4 PPy / CNT / Tyr / GC çalışma elektroduna ait tekrarlanan 45 µM'lık katekol ölçümleri (tarama hızı 100 mVs ⁻¹ ;pH:7,0).....	41
Şekil.5.5 PPy/Tyr/GC çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği (tarama hızı 100 mVs-1)	42
Şekil 5.6 0,1 mL/dak (a), 0,25 mL/dak (b), 0,5 mL/dak (c), 1 mL/dak (d), 2 mL/dak (e), 4 mL/dak (f), 6 mL/dak (g) akış hızlarında katekol enjeksiyonlarından elde edilen pik oluşumları katekol için farklı debilerde pikler (tarama hızı 100 mVs-1, pH:7,0)	43
Şekil 5.7 0.003mM (a), 0.005mM (b), 0.0075mM (c), 0.01mM (d), 0.02mM (e), 0.03mM (f), 0.05mM (g), 0.1mM (h), 0.2mM (i), 0.3mM (j), 0.5mM (k), 1mM (l), 2mM (m), 3mM (n), 5mM (o) katekol enjeksiyonları sonucu elde edilen pik oluşumları	44
Şekil 5.8 PPy/Tyr/GC çalışma elektroduna ait tekrarlanan 45 µM'lık katekol ölçümleri (tarama hızı 100 mVs ⁻¹ ;pH:7,0;).....	45
Şekil 5.9 PPy/MWCNT/Tyr/GC ve Ppy/Tyr/GC elektrotları için kalibrasyon eğrileri	46
Şekil 5.10 PPy/Tyr/GC (a), PPy/CNT/Tyr/GC (b) çalışma elektrotlarına ait dönüşümlü voltametri grafiği 0.1 M fosfat tamponu(pH 7.0); 0- +1.2 V ;tarama hızı, 50mVs-1.)	47
Şekil 5.11 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi (pH:7,0)	48
Şekil.5.12 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodu için optimum pH'nın belirlenmesi.....	49
Şekil 5.13 4-Asetamidfenol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50mV)	50
Şekil 5.14 4metoksifenol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50mV)	50
Şekil 5.15 Katekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50mV)	51
Şekil 5.16 p-kresol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50mV).....	51
Şekil 5.17 pyrokatekol için (a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50mV)	52
Şekil 5.18 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için stabilitesi	

(pH=7,0; V=-50mV)	53
Şekil 5.19 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması (pH=7,0; V=-50mV)	54
Şekil 5.20 PPy/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi(pH:7.0)	56
Şekil 5.21 PPy/Tyr/GC çalışma elektrodu için optimum pH'nın belirlenmesi (V=-50 mV) ...	57
Şekil 5.22 pyrokatekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V= -50mV)	58
Şekil 5.23 pyrogallol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V= -50mV)	58
Şekil 5.24 p-benzokinon için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V= -50mV)	59
Şekil 5.25 Hidrokinon için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V= -50mV)	59
Şekil 5.26 .katekol için (a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V= -50mV)	60
Şekil 5.27 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması(pH=7,0; V=-50mV)	61
Şekil5.28 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC (a); Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC(b) çalışma elektrotları dönüşümlü voltametri eğrisi	64
Şekil 5.29 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi	65
Şekil 5.30 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum pH'sının belirlenmesi	66
Şekil 5.31 Hidrokinon için(a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)	67
Şekil 5.32 p-benzokinon kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)	68
Şekil 5.33 Katekol akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)	68
Şekil 5.34 Pyrokatekol kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)	69
Şekil 5.35 Pyrogallol kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)	69
Şekil 5.36 4-aminofenol kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)	70
Şekil 5.37 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması (pH=7,0; V=+100mV)	71
Şekil 5.38 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi (pH=7,0)	73
Şekil 5.39 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum pH'sının belirlenmesi (V= +100 mV, pH=7,0)	74
Şekil 5.40 4-aminofenol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)	75
Şekil 5.41 Katekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)	75
Şekil 5.42 Hidrokinon için(a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)	76
Şekil 5.43 p-benzokinon için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100 mV)	77
Şekil 5.44 Pyrogallol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100 mV)	77
Şekil 5.45 Pyrokatekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100 mV)	78
Şekil 5.46 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması (pH=7,0; V=+100mV)	79
Şekil 5.47 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotu dönüşümlü voltametri eğrisi	81
Şekil 5.48 PPy/Tyr/CNT/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi (pH=7,0)	82
Şekil 5.49 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum pH'sının belirlenmesi pyrokatekol ile	83
Şekil 5.50 4Aminofenol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50 mV)	84
Şekil 5.51 Katekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50 mV)	84
Şekil 5.52 Hidrokinon için(a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50 mV)	85
Şekil 5.53 Pyrogallol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50 mV)	86

Şekil 5.54 Pyrokatekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50 mV).....	86
Şekil 5.55 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması (pH=7,0; V=-50mV)	87
Şekil.5.56 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotu dönüşümlü voltametri eğrisi.....	90
Şekil 5.57 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi (pH=7,0)	91
Şekil 5.58 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum pH'sının belirlenmesi (V=+100 mV,pH=7,0).....	92
Şekil 5.59 4-aminofenol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV).....	93
Şekil 5.60 Hidrokinon için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV).....	93
Şekil 5.61 Katekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV)	94
Şekil 5.62 Pyrogallol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV)	94
Şekil 5.63 p-benzokinon için(a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV)	95
Şekil 5.64 Pyrokatekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV).....	96
Şekil 5.65 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması (pH=7,0; V=+100mV).....	97
Şekil 5.66 Fenolik türlere ait GC-MS kromatogram görüntüsü	100

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 5.1 PPy/MWCNT/Tyr/GC ve Ppy/Tyr/GC elektrotlarının analitik özellikleri.....	45
Çizelge 5.2 PPy / CNT /karbodiimid/ Tyr / GC çalışma elektrotu için analitik parametreler..	54
Çizelge 5.3 PPy /Tyr /GC çalışma elektrotu için analitik parametreler.....	62
Çizelge 5.4 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/karbodiimid/Tyr/GC çalışma elektrodu analitik parametreler.....	71
Çizelge 5.5 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC çalışma elektrotu analitik parametreleri.....	79
Çizelge 5.6 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotu analitik parametreleri.....	88
Çizelge 5.7 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotu analitik parametreleri.....	97
Çizelge 5.8 GC-MS Ölçüm metoduyla elde edilen analitik parametreler.....	100

ÖNSÖZ

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde benden destek, yardım ve inançlarını esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof.Dr.Ferruh Ertürk ve Prof.Dr. Bülent Keskinler'e, anlayışından ötürü Prof.Dr.Ahmet Demir'e, manevi ve bilimsel anlamda büyük desteğini gördüğüm Doç.Dr.Elif Erhan'a, çok sevgili mesai arkadaşlarıma, beraber çalıştığımız keyifli zamanlar için Arş.Gör.Şeyda Korkut Özöner'e, her zaman yanımda olduklarını hissettiren çok sevdiğim aileme, varlığıyla bana en büyük gücü veren kızım Beril Ada'ya teşekkür ediyorum.

Ayrıca; TÜBİTAK'a ÇAYDAK 105Y130 no'lu “ Amperometrik Fenol Biyosensörlerinin Geliştirilmesi” konulu, Doç.Dr. Elif Erhan'ın yürütücülüğünde gerçekleştirdiğimiz projeye desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

Ocak 2010,

M.Mevra Yalvaç

ÖZET

AMPEROMETRİK FENOL BİYOSENSÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

M.Mevra YALVAÇ

Çevre Mühendisliği, Doktora Tezi

Alıcı ortamların kirlilik yükü kapasitelerinin belirlenmesi, buna dair önlemlerin yerinde ve zamanında doğru biçimde alınabilmesi ve çevre denetim sisteminin işleyebilmesi için iyi bir izleme tekniğinin oluşturulması şarttır. Çevresel kirleticilerin izlenmesi amacıyla kirletici parametrelerin yapılarına ve karakterlerine göre geliştirilmiş standart analiz metotları hali hazırda mevcuttur. Söz konusu analiz metotları farklı bileşenlerden oluşmuş numunelerin analiz edilmesinde ve bazı karışık numunelerin ön arıtıma tabi tutulma gereksinimlerine bağlı olarak hatalı sonuçlar verebilmektedir. Mevcut analiz metotlarında görülen bu sıkıntılardan dolayı, alternatif analiz metotlarından biri olarak kullanılmaya başlanan biyosensörler hedefe yönelik hızlı, güvenilir ve anlık sonuçlar verebilmektedirler. Çevre mühendisliğinde izlenmesi gereken en önemli parametrelerden biri fenol ve fenol türevleridir. Bu çalışmada, su kaynakları ve atıksularda izlenmesi gereken en önemli kirletici parametrelerden olan fenol ve fenol türevlerinin güvenli, seçici, hassas ve hızlı ölçülmesi amacıyla farklı şekillerde hazırlanmış kompozit çalışma elektrotlarından oluşmuş fenol biyosensörleri geliştirilmiştir. Söz konusu çalışma elektrotlarında *tyrosinaz* enzimi kullanılmıştır. Kompozit çalışma elektrotlarının yapımında orjinal iletken polimerler ve karbon nano tüp malzeme kullanılmış ve *tyrosinaz* enzimi bu iletken polimer kompozitler üzerine farklı metotlarla bağlanmıştır. Hazırlanmış olan 8 çalışma elektrotu kullanılarak geliştirilen biyosensörler kesikli ve sürekli sistemlerle fenol tayininde kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensörlerde 18 farklı fenol türü analiz edilmiş, ölçüm için gerekli kalibrasyon eğrileri çizilmiş, bu kalibrasyon eğrileri kullanılarak ölçüm analitik parametreleri hesaplanmıştır. Analitik parametrelere göre biyosensörlerin performansı, ölçüm güvenilirliği tartışılmıştır. Ayrıca biyosensörlerden çıkan sonuçlar ile GC-MS fenol tayininden elde edilen sonuçlar kıyaslanmıştır.

Anahtar kelimeler: Tyrosinaz, amperometrik sensör, fenol biyosensörü, biyosensör, iletken polimerler

ABSTRACT

DEVELOPMENT of AMPEROMETRIC PHENOL BIOSENSORS

M.Mevra YALVAÇ

Environmental Engineering, Ph.D. Thesis

Determination of load capacity of the receiving environment pollution, it measures about the appropriate and timely, and environmental control systems can be correctly functioning well for the establishment of a monitoring techniques is essential. Monitoring of environmental contaminants polluting the purpose and character of the parameters according to the structures already developed standard methods of analysis are available. The analysis methods to analyze samples were made up of different components and some mixed samples subjected to pre-treatment, depending on the requirements to be able to provide erroneous results. Because of these difficulties seen in the current analysis methods, alternative methods of analysis used to be one of the biosensors targeted fast, reliable and can give instant results. Environmental engineering to follow one of the most important parameters are the phenol and phenol derivatives. In this study, phenol biosensors comprised of various composite working electrodes have been developed in order to get confident, selective, sensitive and fast detection of phenol and phenol derivatives, which should be detected in wastewaters. Tyrosinase was used at these working electrodes. Original conductive polymers and carbon nano tubes material were used to fabricate the composite working electrodes, tyrosinase was immobilized to these composite polymer working electrodes by using different immobilization methods. Biosensors developed using 8 working electrodes were operated at batch and continuous flow systems for the phenol detection. Eighteen phenol derivatives were analyzed, calibration curves necessary for measurement were constructed and the analytical parameters were calculated from these calibration curves. The performance of biosensors and the reliability of the measurement were discussed. Also, the results of biosensors and GC-MS measurement method were compared.

Keywords: Tyrosinase, amperometric sensor, phenol biosensor, biosensor, conductive polymers.

1. GİRİŞ

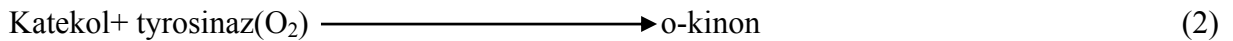
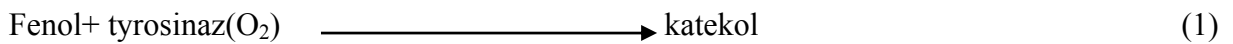
Endüstriyel proseslerin, bu proseslerin havaya suya veya toprağa kirletici salınımlarının ve bu salınımların çevreye etkilerinin izlenmesi çevresel düzenleyici sistemin anahtar unsurudur. Alıcı ortamların kirlilik yükü kapasitelerinin belirlenmesi, buna dair önlemlerin yerinde ve zamanında doğru biçimde alınabilmesi ve çevre denetim sisteminin işleyebilmesi için iyi bir izleme tekniğinin oluşturulması şarttır. Alıcı ortama deşarj edilen herhangi bir kirletici parametrenin miktarının belirlenmesi, mevcut kirleticinin deşarj ve alıcı ortam standartlarına uygunluğunun tespiti açısından oldukça önemlidir. Çevresel kirleticilerin izlenmesi amacıyla kirletici parametrelerin yapılarına ve karakterlerine göre geliştirilmiş standart analiz metotları hali hazırda mevcuttur. Söz konusu analiz metotları farklı bileşenlerden oluşmuş numunelerin analiz edilmesinde ve bazı karışık numunelerin ön arıtıma tabi tutulma gereksinimlerine bağlı olarak hatalı sonuçlar verebilmektedir. Mevcut analiz metotlarında görülen bu sıkıntılardan dolayı araştırmacıların son yıllarda alternatif analiz metotlarının geliştirilmesi üzerine yaptıkları çalışmaları hız kazanmıştır. Alternatif analiz metotlarından biri olarak kullanılmaya başlanan biyosensörler hedefe yönelik hızlı, güvenilir ve anlık sonuçlar verebilmektedirler. Kirleticilerin anında analiz edilebilmesi özellikle arıtma reaktörlerinin otomatik kontrolünde rahatlıkla kullanılabilmekte veya ortamdaki kirleticinin sürekli izlenmesi ile gerekli önlemlerin alınabilmesine izin vermektedir. Amerika ve Avrupa’da giderek artan çevresel sınırlamalar hava, toprak ve özellikle sulardaki kirleticilerin güvenilir ve hızlı analizlenmesini zorunlu hale getirmiştir. Birçok standart analiz metodunda görülen girişim problemleri biyosensörlerin kullanımıyla numuneye ön arıtım işlemi uygulama gereği duyulmadan ortadan kaldırılabilmiştir. Biyosensör teknolojisi fizik, kimya ve biyoteknoloji alanlarını kapsayan çok disiplinli bir teknolojidir. Biyosensörlerin çalışma prensibi olan elektron alış-verişi başlı başına fiziğin, biyosensör ana elemanlarından çalışma elektrotlarının kaplandığı iletken polimerlerin sentezi kimyanın, bu iletken polimerlere bağlanan enzim, doku ve mikroorganizma gibi materyaller biyoteknolojinin araştırma alanlarına girmektedir.

Çevre mühendisliğinde izlenmesi gereken en önemli parametrelerden biri fenol ve fenol türevleridir. Fenoller bir benzen ya da benzenoid halkasına direkt olarak bağlanmış bir hidroksil grubu içeren bileşiklerdir. Fenol, bu grubun ana bileşiği olan monohidroksibenzene (C_6H_5OH) verilen özel bir isimdir. İlk olarak 1839 yılında F. Runge tarafından kömür katranından ayrılmış ve “karboksilik asit” olarak adlandırılmıştır. Fenol ve bağlı (substituted) fenoller çevre kirlenmesi açısından önemli yer tutmaktadır. Bu kimyasallar, plastikler,

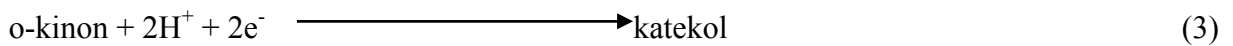
boyalar, ilaç ve antioksidan üretimi, kağıt ve kağıt hamuru gibi pek çok endüstriyel sürecin bir bileşeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Pek çok fenol bileşiği biyolojik sistemler üzerinde zehirli ve tehlikeli etkiye sahip olup sular vasıtasıyla besin zincirine girmektedir. Fenollerin 1 ppb'den düşük seviyeleri bile suyun tat ve koku özelliklerini değiştirebilmektedir. Fenolik bileşiklerin canlı türler için ne kadar zararlı oldukları gayet iyi bilinmektedir. Fenoller doğal membran yapısına kolaylıkla nüfuz ederek genotoksik, mutajenik ve hepatoksik etkiler göstermekte, respirasyon ve fotosentezin kataliz mekanizmasını olumsuz yönde etkilemektedir. Tüm bu nedenlerle fenollerin çevre açısından bulundukları ortamda miktarlarının ve yerine göre türünün belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Cockerman ve Shane, 1994).

Fenollerin kantitatif analizi için kullanılan başlıca standart metotlar yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC), elektrokimyasal kapiler elektroforez (CE), spektrofotometrik, kağıt elektroforezi, ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi (GC) (ECD, FID ile), gaz kromatografisi kütle spektrometri metodu (MS), UV ölçümlü ince tabaka kromatografisi ve mikrodalga indüklenmiş plazma emisyon spektroskopisi (MIP-ES) teknikleridir. Ayrıca söz konusu tekniklerin çevre numunelerinde doğrudan kullanılmaları da mümkün olmamaktadır. Çevre konularını ilgilendiren ölçümlerde fenol bileşikleri numuneler içerisinde genellikle iz seviyede ve oldukça karışık halde bulunduklarından numuneler cihazlara alınmadan önce çeşitli ekstraksiyon, temizleme ve seyreltme aşamalarından geçirilmektedir. Bu işlemler zaman alıcı, zahmetli ve duyarlı değildir. Bu nedenle fenollerin kantitatif ölçümleri için daha güvenilir, daha duyarlı, seçici ve hızlı ölçüm yapabilen biyosensörler geliştirilmektedir (Vincoli, 1996).

Tyrosinaz, fenol biyosensörlerinde geniş bir şekilde kullanılan fenol katalizleyen enzimlerden biridir. Tyrosinaz, moleküler oksijeni kullanarak, monofenollerin, o-difenollere hidroksilasyonunu ve o-difenollerinde o-kinonlara oksidasyonunu katalizler (Liu vd., 2003)



o- kinonlar, herhangi bir elektrontransfer aracı olmaksızın aşağıda verilen eşitliğe göre düşük potansiyellerde o-difenollere indirgenebilirler.



Son yıllarda yapılan çalışmalarda, fenol ölçümleri için, tyrosinaz tabanlı çeşitli elektrot

hazırlama metodları geliştirilmiştir. Bu araştırmalarda camımsı karbon(glassy carbon) (Dempsey vd.,2004; Sanz vd., 2005), grafit-epoksi resin(Wang vd., 1994), altın (Campuzano vd.,2003) ve diğer materyaller(Liu vd., 2003; Rogers vd., 2000; Serra vd.,2002) gibi geleneksel elektrot malzemelerinin kullanıldığı belirtilmiştir. Zejli ve arkadaşları sonojel-karbon dönüştürücülü alüminyum sol-jel ile tyrosinaz enzimi kullanarak bir fenol biyosensörü geliştirmişlerdir. Sol-jel matriksinin yüksek enzim yükleyebilme kapasitesi ve poroz bir yapıya sahip olması nedeniyle hızlı bir cevap süresi elde etmişlerdir. Linner aralık 0,5-30 μM , belirleme limiti ise 0,3 μM olarak bulunmuştur (2008). Njagi ve Andreescu kimyasal olarak sentezlenmiş bir Au-Ppy nanokompozite tyrosinaz enzimi tutuklayarak glikoz ve fenol ölçümü yapabilen bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Pirol konsantrasyonu, enzim miktarı, pH ve uygulanan potansiyel gibi parametreleri incelemişlerdir. Belirleme limiti glikoz ve fenol için sırasıyla 2.10^{-6} M ve 3.10^{-8} M olarak bulunmuştur (Castillo vd., 2004). Li ve çalışma arkadaşları mediatörsüz bir fenol biyosensörü geliştirmişlerdir. Bu sensör ZnO nanopartiküllerine tyrosinaz enzimi tutuklayarak GCE hazırlanmasıyla elde edilmiştir. p-kresol, fenol ve katekol için hassasiyet değerleri sırasıyla 187, 182, 114 $\mu\text{A}/\text{mM}$ olarak bulunmuştur (2006). Boron- doped elmas elektrota tyrosinaz enziminin karbodiimid ile çapraz bağlanmasıyla hazırlanan bir fenol biyosensörü geliştirilmiştir. Sensörün optimum pH değeri 6,5; potansiyeli ise -0,15 V olarak bulunmuştur. Fenol için hassasiyet 232,5 mA/Mcm^2 ; lineer aralık 1-200 μM ve belirleme limit 0,2 μM olarak bulunmuştur (Zhao ve Zhi, 2006).

Ayrıca biyosensör uygulamaları sürekli sistemlerde de çalışılmıştır. Sürekli sistemlerde yapılan denemelerde biyosensörün hızlı cevap süresine, yüksek hassasiyete ve iyi tekrarlanabilirlik özelliklerine sahip olduğu belirtilmiştir (Hansen, 1996; Yang vd., 2006). Fakat bu avantajlarına rağmen sürekli sistemlerde fenol biyosensörleri ile ilgili fazla bir araştırma yapılmamıştır (Dantoni vd.,1998; Freire vd.,2002).

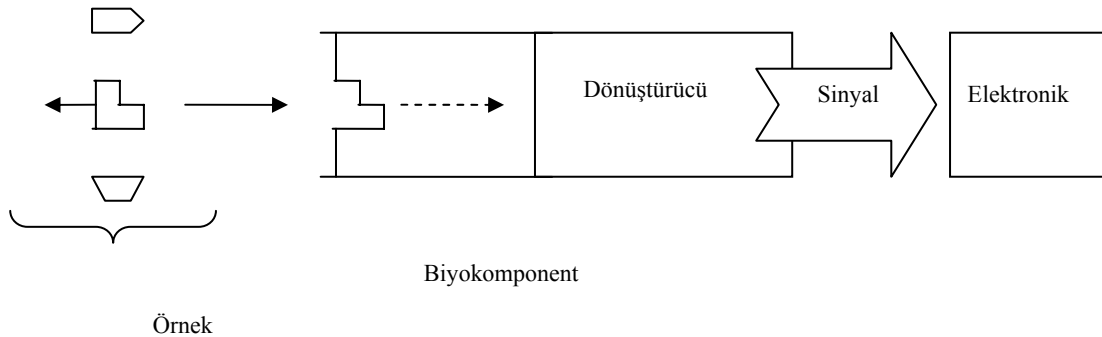
Bu çalışmada çevre açısından önemli 18 farklı fenol türünün amperometrik ölçümü için farklı çalışma elektrotlarıyla hazırlanmış biyosensörler geliştirilmiştir. Bu amaçla cam karbon elektrot üzerinde farklı tip ve şekillerde kompozit filmler sentezlenmiş ve farklı bağlama metodları ile tyrosinaz enzimi bu kompozit polimerlere immobilize edilmiştir. Hazırlanan her çalışma elektrodunda 18 farklı fenol ölçümü sürekli ve kesikli sistemler kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm sonuçlarından kalibrasyon eğrileri elde edilmiş, bu eğriler kullanılarak gerekli analitik hesaplamalar yapılmıştır. 18 farklı fenol türünün ölçümü aynı zamanda GC-MS metoduyla da yapılmış ve sonuçlar biyosensör sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan fenol bileşiklerine ait kimyasal formüller Ek-1’de verilmiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerde amperometrik ölçüm metodu kullanılmıştır. Kesikli deney düzeneği ve sürekli deney düzeneği olmak üzere iki farklı deney düzeneğinde çalışılmıştır. Deneysel çalışmalarda; akımın etkisini etkilediği düşünülen çeşitli iletken polimerler ve maddeler kullanılmıştır.

2. BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, ölçümü istenen bileşen (analit) ile uygun bir biyoajan (biyomolekül) arasındaki etkileşimin dönüştürücüler (transducer) yardımı ile elektrik sinyallerine dönüştürüldüğü ve bu sinyallerin elektronik yöntemlerle analit konsantrasyonu cinsinden ifade edildiği analitik cihazlardır. Biyosensör sistemleri genel olarak üç temel bileşenden oluşur. Bunlar, seçici tanıma mekanizmasına sahip biyoajan (biyomolekül), bu biyoajanın analit ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştüren çevirici (transducer) ve elektronik bölümler olarak sıralanabilir. Genel olarak bir biyosensörün ana elamanları Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Bu ana elamanların en önemlisi analite karşı son derece seçimli ve tersinir etkileşmeye sahip biyoajanlardır. Biyoajanlar, biyoafinite ve biyokatalitik olmak üzere iki grupta toplanabilir. Biyoafinite ajanları (örneğin antikorlar) analitlerle kompleks oluşturarak analitin moleküler tanımlanmasında kullanılırlar. Bu kompleks oluşumu, tabaka kalınlığı, kırılma indisi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimine neden olur. Biyokatalitik ajanlar ise analitin molekül yapısında değişime neden olur ve bu dönüşüm sonucunda ortamda artan veya azalan madde miktarı takip edilerek değerlendirilir. Biyokatalitik ajan olarak enzimler, mikroorganizmalar, organlar, tüm hücreler, bitki veya hayvansal doku parçaları kullanılmaktadır (Turner, 2000).

Biyosensörün ikinci önemli elamanı çevirici kısımdır. Çeviriciler biyoajan-analit etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyallerin elektrik sinyallerine dönüştürüldüğü biyosensör elamanlarıdır.



Şekil 2.1 Biyosensör ve ana elamanları

İlk biyosensör uygulamaları 1960 yıllarında tıp alanında başlamış ve günümüzde biyoteknoloji devriminin verdiği ivme ile birçok alanda kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Günümüzde biyosensörler klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, proses kontrol, biyoreaktörler, ilaç sanayi, madencilik, savunma sanayi, arıtım ve kontrol teknolojileri gibi birçok alanda çok yaygın kullanılmakta ve bu konularda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Hatta son yıllarda biyosensör kavram ve tanımlarında önemli değişme ve genişlemelere paralel olarak, algılama mekanizmaları (görme, işitme, koku alma, tat alma) ideal biyosensör olarak görülmekte ve bu mekanizmaların yapay olarak üretilmesi çalışmaları hızla devam etmektedir. Biyosensör sektörünün toplam satışları incelendiğinde 1990 yılında 35 milyon dolar olan toplam satış miktarı, 1995 yılında 895 milyon dolara ve 2002 yılında 2,5 milyar dolara yükselmiştir (Castillo vd., 2004).

Biyosensör satışlarında meydana gelen baş döndürücü artışlar, özellikle bu alandaki üretici firma sayılarını arttırdığı gibi, firmaların biyosensörlerle ilgili araştırma ve geliştirme faaliyetlerini de etkilemiş ve son yıllarda firmalar tarafından patentlenmiş çalışmaların sayısında büyük artışlar meydana gelmiştir. Halen gerek akademik gerekse firma bazında biyosensör çalışmaları artan bir hızla devam etmektedir.

Elektroanalitik kimyasal teknikler, çevre koruma ve kirlenmenin sürekli izlenmesi açısından giderek önem kazanmaktadır. Özellikle elektrokimyasal sensör ve detektörler, öncelikli kirleticilerin yerinde izlenmesi çalışmalarında önemli rol oynayan elektroaktif türlere karşı seçici, duyarlı, hızlı, hassas, kompakt, taşınabilir ve ucuz sistemlerdir.

Uzun zamandır, pH ve oksijen elektrotları gibi elektrokimyasal cihazların çevre analizlerinde kullanıldığı bilinmektedir. Elektrokimyasal sensör teknolojilerindeki son gelişmeler organik ve anorganik kirleticilerin uygun sensörler yardımı ile yerinde, hızlı ve hassas bir şekilde ölçümüne izin vermektedir. Bu sensörlerden birisi bir biyoajan kullanan biyosensörlerdir. EPA, çevresel izleme teknolojilerinin geliştirilmesini sağlamak amacıyla bu tür sensörlerin üretimi ve geliştirilmesini destekleyici teşvikler vermekte ve bu sensörlerin hava, su, toprak, atıksu ve yeraltı sularının sürekli izlenmesi çalışmalarında kullanılmasını desteklemektedir.

Biyosensörlerin çeşitli ortamlarda (toprak, hava, arıtma tesisi) kirleticilerin konsantrasyonlarını ölçme ve izleme potansiyeli yanında bu tekniklerin konvansiyonel analiz metodlarına göre daha ucuz olması ve ortamda kirleticinin davranışının sürekli izlenebilmesi gibi çok önemli avantajları vardır. Kirleticilerin anında analiz edilebilmesi, özellikle arıtma reaktörlerinin otomatik kontrolünde rahatlıkla kullanılabilir veya ortamdaki kirleticinin

sürekli izlenmesi ile gerekli önlemlerin alınabilmesine izin verir. USA ve EU de giderek artan çevresel sınırlamalar hava, toprak ve özellikle sulardaki kirleticilerin güvenilir ve hızlı analizlenmesini zorunlu hale getirmiştir. Konvansiyonel analiz metotları oldukça pahalı, uzun zaman alan ve uzmanlık gerektiren tekniklerdir. Buna karşın biyosensörler düşük maliyetli ve taşınabilir olduklarından yerinde analiz imkanı sağlayan, hassas ve güvenilir biyoanalitik sistemlerdir (Turner, 2000).

2.1 Güç Çeviriciler

Güç çeviriciler biyoaktif tabakadan meydana gelen uyarıcıyı elektrik sinyaline dönüştüren ve elektronik ile gücü artırılıp analitik uygulanabilir detaya çeviren fiziksel bir elementtir (elektrot, optik tel, quartz kristali, termistör).

2.1.1 Elektrokimyasal Güç Çeviriciler

Platin, altın, camısı karbon, grafit, CPE (karbon hamuru) ve ampermetre için epoksi-karbon numunelerinden yapılmaktadır. Analit biyokatalik değişime uğrayarak elektrotta reaksiyona giren elektroaktif bileşikler oluşturmaktadır. İyon seçici elektrotlar ve iyon değiştirici alan etkili transistörler (ISFET) biyosensörler için potansiyometrik güç çeviricilerdir (Turner, 2000; Hara vd., 2002).

2.1.1.1 Amperometrik Biyosensörler

Ampermetre, sabit potansiyel uygulanan sürekli akım durumlarını izlemek üzere kurulmuştur. Sistem, çalışan, referans ve yardımcı elektrot olmak üzere üç elektrottan oluşmaktadır. Çalışan elektrotun potansiyel kararlılığı potansiyostat ile kontrol edilmektedir. Çalışan elektrot immobilize biyoaktif tabaka içermektedir. Bu üç elektrotun tasarımı hareketsiz veya karıştırmalı şartlarda ve akış sistemlerinde olmak üzere iki çeşit hidrodinamik şartta uygulanabilir. Amperometrik biyosensörün yanıtı;

- Analit veya kofaktörün biyokatmana difüzyonu,
- Enzimatik reaksiyon,
- Ürünlerin biyo katman içine veya dışına difüzyonu,
- Ürünün veya kofaktörün elektrokimyasal olarak ortaya çıkması,
- Elektrokimyasal reaksiyon sonucu oluşan ürünün biyo katman dışına difüzyonuna

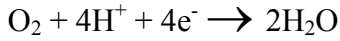
bağlıdır.

Amperometrik biyosensörlerde istenen işletme şartlarında akımın enzim kinetikleri veya elektrot kinetikleri yerine analitin kütle transferi ile sınırlandırılması istenmektedir. Amperometrik biyosensörlerde üç farklı elektron transferi gözlenmektedir.

I. Üretim

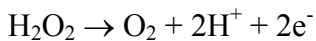
Oksidoredaktaz enzimler genelde amperometrik güç çeviricilerde birleştirilmektedirler. Elektrokimyasal amperometrik biyosensörlerin ilk kategorisi enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin (hidrojen peroksit, NADH, veya kofaktör yapısının izlenmesi, oksijen) ölçümüne dayanmaktadır.

Oksijen Ölçme: Clark elektrotu örnek çözeltiyi gaz sızdıran membrandan ayıran iki elektrot sisteminden oluşmaktadır. Oksijenin bu membrandan difüzyonu 700 mV'ta platin katotta azalmaktadır.



Sürekli akımın sürekli hale gelmesi ile sonuçlanan bu olay oksijen basıncı ile doğru orantılı ve besin konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Engelleyen türlerin etkisi enzimin seçiciliği ve gaz geçiren membranın (permselectivity) seçiciliği ile azalmaktadır. Oksijenin besinlere göre daha fazla olduğu bir durumda besinler için sistemin birinci derece kinetiklerine uyduğu zaman sinyalin analit konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğunu söylemek henüz pahalı bir sistemdir. Clark tip oksijen glukoz elektrotu, iki altın elektrotu, polyelektrotu ve biyo katman ile kaplanmış gaz geçiren tabaka ile birlikte ince silikon besin üzerine imal edilebilir. Bu sensörün glukoz için dinamik aralığı 56µm – 1.1 mM'dır. Oksijen esaslı biyosensörlerin kinetik davranış teorileri Rinken *et. al.* tarafından tartışılmıştır (Rinken vd., 1998)

Hidrojen Peroksit Ölçme: H₂O₂ üreten oksidaz enzimi içeren biyokatmanın çalışan elektrot yüzeyine immobilizasyonu olarak tanımlanır ve genellikle 700 mV' da anot gibi çalışan Pt elektrotudur.



Seçicilik, selüloz asetat ince tabakasının elektrotu sarmasıyla oluşur. Bu tabaka *ca.* 100D gibi moleküler kesiciden oluşmakta ve böylece H₂O₂ gibi küçük moleküllerin geçişine imkan tanımakla beraber engelleyen türleri geri çevirmektedir. Hidrojen peroksitin platin elektrotta yüksek potansiyelde oksidasyonu ve ascorbate, urate, paracetamol gibi okside olabilir türlerin

elektrokimyasal olarak engelleyici olmalarından dolayı büyüklük seçici katmanın olması zorunludur.

Hidrojen peroksitin bulunması (detection), hidrojen peroksitin engelleyici türlerin aktif olmadığı düşük potansiyelerde Pt elektrotunda indirgenmesi olarak tanımlanabilir. Horseradish peroxidase gibi katalistlerin veya diğer elektrot materyallerinin (Pd + Au) H_2O_2 'yi katalizlemesi araştırılmıştır.

NADH Ölçme: Dehydrogenases için kullanılmaktadır. NADH oksidasyonu yüksek potansiyel istemekte ve oksidasyon ürünü polimerizasyonu yüzeyi kirletmektedir. NADH esaslı biyosensörlerin ana problemi ikincil ürün olan NAD^+ yı biyokatmana immobilize etmektir. Yoksa NAD^+ biyosensörün stabilitesi bozulduğu anda biyokatmandan kurtulmaktadır.

II. Üretim (İkinci Üretim)

İkinci üretimde amperometrik biyosensörler enzim redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında transfer aracı kullanılmaktadır. Aracılar, metallerin inorganik veya organik kompleksleri, organik maddeler ve polimerler olabilirler. Aracının organik molekülü ne kadar büyükse, lipofilik karakteri de o kadar büyüktür ve stabilitesi daha iyidir. Aracılar, enzim redoks merkezi veya enzimatik reaksiyon ürünü ile reaksiyona giren küçük moleküllerdir ve okside olan veya azalan aracılar düşük potansiyelerde elektrokimyasal redox reaksiyonlara hızla girebilirler.

Birinci tip aracılar, ferricyanide, 1,4-benzoquinone (1,4-BQ), 1,4-phenylenediamine, ferrocene (Fc), tetrahydrofulvalene (TTF), tetracyanoquinodimethane (TNCQ), N-methylphenazinium, Meldola's blue, methylene green, methylene blue gibi inorganik veya organik bileşiklerden oluşan (water-soluble) suda çözünabilirlerdir. Çözülebilir aracıların enzim biyokatmanından sızması gibi problemleri mevcuttur.

Ferrocene ve tetrahydrofulvalene türevleri gibi suda çözünmeyen bileşiklerin oluşturduğu geliştirilmiş aracılar da mevcuttur. Bu aracılar enzim ile birlikte biyo katmanda immobilize olurlar. Meldola's blue gibi besinlerin kovalent bağlarla silika jel üzerine bağlanması ile çözünabilir aracıların çözünürlüğü giderilebilir. Daha sonra bu partiküller enzim katmanıyla kaplanan CPE ile karıştırılırlar.

Son yıllarda ferrocene veya tetrahydrofulvalene ile tutturulmuş polimerler veya osmiyum, rutenyum veya paladyum içeren polimerler gibi redox polimerler esas alınarak yeni aracılar araştırılmıştır (Malhotra vd., 2006).

Polimerleri taşımak enzim ve polimer arasında yüksek derece ilişki sağlamasından avantajlıdır. Bu durum elektron transfer kinetiklerini hızlandırmakta ve enzimin işlemini arttırmakta ve böylece besin dönüşüm hızını arttırmaktadır.

III. Üretim (Üçüncü Üretim)

Burada enzimin aktif merkezi ile elektron yüzeyi arasındaki elektron transferi direkt olarak meydana gelmektedir. Enzimler elektron transferini güçleştiren daha doğrusu engelleyen protein kabuktan oluştuğundan bu tip davranışı gösteren birkaç enzim mevcuttur. Bunlar arasında horseradish peroxidase elektronları direkt transfer edebilir çünkü bunun redox merkezi protein kabuğun dışında kalmaktadır. Akım eğimleri enzimlerin elektrot ve redox merkezi arasındaki yakınlıktan oluşan molekül biçimiyle bağlantılıdır.

2.1.1.2 Potansiyometrik Güç Çeviriciler

Potansiyometrik sensörlerin çıktısı zamanın bir fonksiyonu olarak oluşan potansiyel değişimdir. Elektrot potansiyeli şu şekilde verilmiştir;

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(a_i + \sum_j k_{i,j}^{pot} \cdot a_j^{z_i/z_j} \right)$$

a_i = çözünmüş çözeltilerin konsantrasyonu

$k_{i,j}^{pot}$ = potansiyometrik seçicilik katsayısı

pH elektrotları ve gaz-sezme membran elektrotları potansiyometrik biyosensörlerin çalışılmış iki tipidir.

2.1.1.3 İyona Duyarlı Alan-Etkili Transistörler (ISFET)

ISFET esaslı elektrotlar iki adet ISFET çipinden ve bir iç elektrottan oluşmaktadır. ISFET'lerden biri biyokatman ile kaplı iken diğeri aktive edilmemiş enzim tabakası ile kaplıdır. Sinyaller arasındaki farklılık kaydedilir. Bu tip sensörler üre, penisilin ve glukoz gibi idrar uygulamalarında ve seyreltilmemiş kan için araştırılmıştır. Farklı analitleri tanımlamak için üzerine multikanal biyosensörlerin yerleştirilen ISFET'ler geliştirilmiştir (Hara vd., 2002).

2.1.1.4 İletkenlik Sensörleri

Bu sensörler biyolojik parçaların immobilize olduğu platin veya altın elektrotlardan oluşmaktadır. Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan ürünler elektrotlar arasında iletkenliği

değiştirmekte ve sinyal oluşturmaktadır. Bu sensörlerin performansı iyonik çevrenin konsantrasyonuna bağlıdır ve böylece meydana gelen herhangi bir değişim önceden bilinmeyen sonuçları oluşturur (Turner, 2000).

2.1.1.5 Empedans Sensörler

Bu sensörler elektrota dalgalı gerilimin uygulanması ve gerilim farkının ölçülmesi uygulamaları üzerine kurulmuştur.

$$Z_s = R_s - \frac{i}{\omega C_s}$$

Z impedansı 'R' resistansta oluşan seriyi ve C' de kapasiteyi göstermektedir. i kompleks alandaki birim, ω ise frekansı ifade etmektedir (Turner, 2000).

2.1.1.6 Kronoamperometrik Sensörler

Reaksiyon ürününün oluşması için enzimatik reaksiyonlara belli bir süre izin verilir (phenols + tyrosinase $\rightarrow$ quinones) ve daha sonra potansiyel adım uygulanır. Zamanın fonksiyonu olarak akım kaydedilir. Biyo-katmanda oluşan Kuinonlar sırasıyla azalmaya başlarlar. Fenoller için biyosensörlerin hassasiyeti bu yolla nM seviyelerine arttırılabilir (Turner, 2000).

Optik güç çeviriciler; fiber optik destekler kullanarak yapılmaktadır. İki optik kurşun, bir kaynak ve dedektör, reaksiyon kabı ve immobilize biyo-katman bölmeden oluşmaktadır. Kimyasal mediated ve non-mediated fiber optik biyosensörler olmak üzere iki grupta sınıflandırılırlar. Kimyasal mediated fiber optik biyosensörler örnek çözeltiden gaz-geçirmez membran ile ayrılan indikatör çözelti veya boya içeren reaksiyon bölgesine bağlı tellerden oluşmaktadır. Non-mediated fiber optik biyosensörlerde ise biyokataliz reaksiyon her bir ürünün veya optik olarak ölçülebilen tüketimin direkt izlenmesi olarak tasarlanmıştır. Fiber optik aletlerin diğer sistemlere göre avantajları bir çok dalga boyunun tek bir optik fiber ile izlenebilmesidir. Ayrıca, ayırıcı referans elemente ihtiyaç yoktur ve sensör rekaliibrasyonu için gerekli güç ölçüm oranları minimumdur.

Piezoelektrik güç çeviriciler; piezoelectric olay mekanik olarak deforme olmuş bazı kristallerin yüzeyindeki elektrik potansiyeline bağlıdır. Kristal sallanan elektrik alan içine yerleştirildiğinde oluşan ters etki piezoelectric kristalin aynı frekansta mekanik olarak titretilmesidir. Pratik uygulaması quartz tabaka üzerinde kütle değişimlerinden kaynaklanan rezonans frekans değişimlerine dayanmaktadır. Yüzeyi biyoaktif tabaka ile kaplayarak güçlü

bir biyosensör elde edilir. Bu biyosensör biyo-katmandaki kütle değişimlerini veya çözeltideki viskozite değişimlerini izleyebilmektedir.

Termal güç çeviriciler; termal güç çeviriciler biyo-reaksiyon süresince genellikle ekzotermik olan sıcaklık değişimlerini belirlemektedir. Isı çözelti içerisinde dağılarak sıcaklığı arttırmaktadır.

$$\Delta t = \frac{Q}{m \cdot c_p}$$

m; sıvı kütlesi, c_p ; çözeltinin termal kütle kapasitesidir.

Deneysel düzenek farklı biçimlerdeki termistor veya transistör parçalarından oluşmaktadır. Bunlardan bir tanesi immobilize biyo-katman içerirken diğeri aktive olmamış aynı tabakayı içermektedir. Sıcaklık farkı zamanın fonksiyonu olarak kaydedilir. Çünkü reaksiyonun ısısı katalizlenmiş enzim reaksiyonları için ölçülebilir. Seçicilik yüksektir fakat termal zeminin yüksek dalgalanmaları ve çözelti içindeki sıcaklığın hızlı seyrelmesi bu sensörlerin hissediciliğini engellemekte ve düşürmektedir.

Elektrokimyasal-parlaklık güç çeviriciler; NAD(P)H gerektiren veya H_2O_2 oluşturan enzimlere bağlanabilen analitler için uygulanabilmektedirler. Ruthenium(II)tris kompleksli luminescent varlığında foton (620nm) uygulanan potansiyel altında emilmektedir. Bu teknik klinik analizlerde glukoz, ethanol, karbondioksit, kolestrol ve glukoz-6-fosfat dehydrogenase'ın tanımlanmasında uygulanabilir (Castillo vd., 2004).

2.2 Biyosensörlerin Çalışma Prensibi

İnce bir tabaka enzimin, elektrokimyasal sensör yüzeyine immobilize edilmesiyle enzim elektrotu elde edilir. Oluşturulan elektrot, uygulanacak örneğin renk ve bulanıklığından etkilenmeden yani örneği bir ön arıtmadan geçirilmeden çalıştırılmalı ve kesin sonuçlar vermelidir. Enzim tabakasına difüze edip tüketilen substrat ya da bu tabakada oluşan ürün elektrokimyasal olarak izlenebilir. İzleme potansiyometrik ve amperometrik olmak üzere iki yolla olabilir. Elektrokimyasal sinyal ile substrat konsantrasyonları arasında bir korelasyon kurulur. Bir enzim elektrotunun cevabı, hem kararlı hal metodu ile milivolt ya da mikroamper olarak, hem de elektrokimyasal sinyalin zamana karşı değişim hızını veren kinetik ölçümle belirlenebilir. Enzimlerin kullanılmasıyla ilgili problemler (stabil olmamaları, tekrar kullanılamamaları gibi) sözkonusu olduğundan, kullanılmalarıyla ilgili kısıtlamalar meydana gelmiştir. Bu sorunları minimize etmek amacıyla enzimler katı desteklere fiziksel ve kimyasal

olarak immobilize edilmektedir (Taylor, 1991).

2.2.1 Enzim İmmobilizasyon Metotları

Enzimin elektrot yüzeyine yüksek aktivite ile ince tabaka içerisinde fiziksel olarak yerleştirilmesi kovalent ve kovalent olmayan metotlarla gerçekleştirilir. Basitçe immobilizasyon, serbest haldeki enzimi elektrot yüzeyinde yarı geçirgen bir membran kullanarak tutmak suretiyle gerçekleştirilir. Elde edilen prob, çoğunlukla kötü stabilite gösterir ve fazla miktarda enzime gereksinim duyar. Fiziksel ya da kimyasal olarak immobilize edilen enzimler, daha iyi bir stabilite gösterir ve diğer maddelerle etkileşimi daha azdır. Tercih edilen immobilizasyon metotları aşağıdaki gibidir:

- Enzimi elektrot üzerinde, inert bir polimerik matriks içinde tutuklama
- Enzimi kendisine ya da başka makrosobik partiküllere (proteinler) fonksiyonel bağlayıcı kimyasallar vasıtasıyla, elektrot yüzeyinde ince tabaka oluşturacak şekilde çapraz bağlama
- Enzimi direkt olarak elektrot yüzeyine ya da suda çözünmeyen membranlara bağlayıcı kimyasallar vasıtasıyla bağlama (Zihnioğlu ve Telefoncu, 1995).

Uygun immobilizasyon seçiminde dikkat edilecek bazı hususlar vardır: Kimyasal yoldan immobilize edilen enzimler desteğin her bölgesinde açıkta iken, tutuklanan enzimler matriks içine giremeyen büyük moleküllerden izole haldedir. Bu yüzden, immobilizasyon tipine göre kinetik ve farklı maddelerle etkileşim her bir metotta farklılık gösterir. Büyük moleküllerin tayininde tutuklanan enzimlerle ölçüm yapılamaz (Taylor, 1991). İmmobilizasyon seçiminde dikkat edilecek diğer hususlar ise enzimin ince bir tabaka halinde ve homojen olması, yüksek aktiviteye sahip olması, hızlı ve hassas ölçüm yapabilmesi şeklinde sıralanabilir (Zihnioğlu ve Telefoncu, 1995).

2.2.1.1 Fiziksel Tutuklama

Poliakrilamid gibi bir jel içine enzimin alınarak sabitlendiği fiziksel bir yerleştirme tekniğidir. Polimer, enzim varlığında çapraz bağ formlarının oluşumuna olanak sağlar. Glikoz oksidaz, katalaz, laktik dehidrogenaz, aminoasit oksidaz, glutamik dehidrogenaz gibi pek çok enzim bu metotla bağlanır. Jellere tutuklanan enzimler, kullanılmadıkları zamanlarda, 0-4°C arasındaki sıcaklıklarda korundukları zaman 3 aydan sonra bile aktivitelerinde minimum kayıplar görülür. Bu yolla tutuklanan glikoz oksidaz, kan içindeki glikozun belirlenmesi amacıyla bir oksijen elektrotuna bağlanır. Oksijendeki azalma monitörize edilir (Taylor, 1991).



2.2.1.2 Kimyasal Tutuklama

2.2.1.2.1 Fonksiyonel Maddelerle Çapraz Bağlama

Enzimlerin fonksiyonel maddelerle çapraz bağlanması, farklı metotlarla gerçekleştirilebilir. Bu metotlar, enzimlerin direkt olarak çapraz bağlanması ya da inert proteinlerle (albumin, jelatin, kalojen) çapraz bağlanması olarak sıralanabilir. İmmobilizasyon işleminde en çok kullanılan fonksiyonel madde gluteraldehit, en çok kullanılan inert madde ise bovine serum albumindir. Teknik, basit ve hızlıdır (Taylor, 1991).

2.2.1.2.2 Suda Çözünmeyen Desteklere Çapraz Bağlama

Enzim immobilizasyonunda en sık kullanılan teknik olup, yüksek stabilite ve yüksek katalitik etki sağlar. Bu teknik ile, elektroiletken taşıyıcılar da olmak üzere birçok taşıyıcı kullanılabilir. Taşıyıcının özelliği enzim immobilizasyonunun şeklini ve prob dayanıklılığını belirlediğinden oldukça önemlidir. Taşıyıcının korozyonu ve bozulması, enzimin işlevsel ömrünü kısaltabilir ve çözünabilir taşıyıcı materyaller enzimin aktif bölgesini inhibe edebilir. Kullanılacak taşıyıcılar, çözünme özelliklerine, fonksiyonel gruplarına, yüzey alanlarına, hidrofilik ve hidrofobik özelliklerine bakılarak seçilir. Gerçekte, inorganikler, doğal polimerler ve sentetik polimerler olmak üzere 3 tip taşıyıcı kullanılır. Bağlanma reaksiyonları enzim denaturasyonuna (üç boyutlu yapının bozulması) neden olmayacak şartlarda gerçekleştirilmelidir. Enzimler, katalitik aktivite için gerekli olmayan fonksiyonel gruplarından bağlanır. Enzimlerin gluteraldehit ile aktive edilmiş taşıyıcılara bağlanması hem kolay, hem de ucuz bir işlemdir (Dinçkaya vd., 1994).

2.2.1.2.3 Elektrot Yüzeyine Direkt Bağlama

Enzimi elektrot yüzeyine direkt bağlama tekniği ile, elektrokatalitik etki, sensörden hızlı sinyal alma ve immobilize enzimi tekrar kullanabilme ihtimali büyük ölçüde artar. Metalik ve karbonlu enzim elektrotlarında, enzimatik reaksiyonlarla oluşan ürünler potansiyometrik sinyaller sonucu belirlenirler. Fakat, bu sinyaller elektrot yüzeyindeki redoks basamaklarına bağlıdır. Ayrıca, elektrotun geçirdiği ön işlemler de sensör sinyallerini etkileyici niteliktedir. Bu sebeple genelde amperometrik enzim elektrotları tercih edilir.

Fiziksel bağlamada, karbonlu materyallerin yüzeyinde bulunan çeşitli fonksiyonel gruplardan dolayı oluşmuş porozite, enzim adsorpsiyonunda etkili rol oynar. Buna rağmen, proses geri dönüşümlüdür, elektrot kötü stabilite gösterir ve sadece birkaç gün içinde aktivitede düşüşler görülür.

Kimyasal bağlamada, bir proteinin taşıyıcıya kovalent bağlanması sonucu daha stabil enzim elektrotları meydana gelir. Bu teknikte ilk adımda taşıyıcının immobilizasyon işlevselliği artırılır. Elektrot yüzeyi, etkili reaktif bölgelerin oluşumu için ısı ile, oksijen radyo-frekans plazma ile, kimyasal ya da elektrokimyasal yollarla okside edilir. Oluşan reaktif bölgeler, ya direkt olarak ya da bir bağlayıcı ajan vasıtasıyla enzimlere kovalent bağlanır. Bağlamada genel olarak gluteraldehit ve karbodiimid gibi kimyasallar kullanılır. Bu kimyasallar sayesinde, enzimler taşıyıcıya bağlanabildiği gibi birbirleri arasında da çapraz bağlar yapar (Taylor, 1991).

2.2.2 Elektrokimyasal Sensörler

Uygun elektrokimyasal sensör seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli hususlar şöyle sıralanabilir.

- Belirlenmesi istenen substratın yapısı (redoks ya da iyon tipleri)
- Yapılan sensörün şekli (mikroelektrotlar)
- Sensör seçiciliği, hassasiyeti ve ölçüm hızı
- Sensörün doğruluğu ve stabilitesi

En sık kullanılan sensörler, potansiyometrik ve amperometrik modlarda çalışan sensörlerdir. Amperometrik enzim elektrotları genişletilmiş bir lineer sinyal aralığına ve potansiyometrik elektrota göre daha büyük Michelis-Menten sabitine (K_m) sahiptir (Dinçkaya vd., 1994).

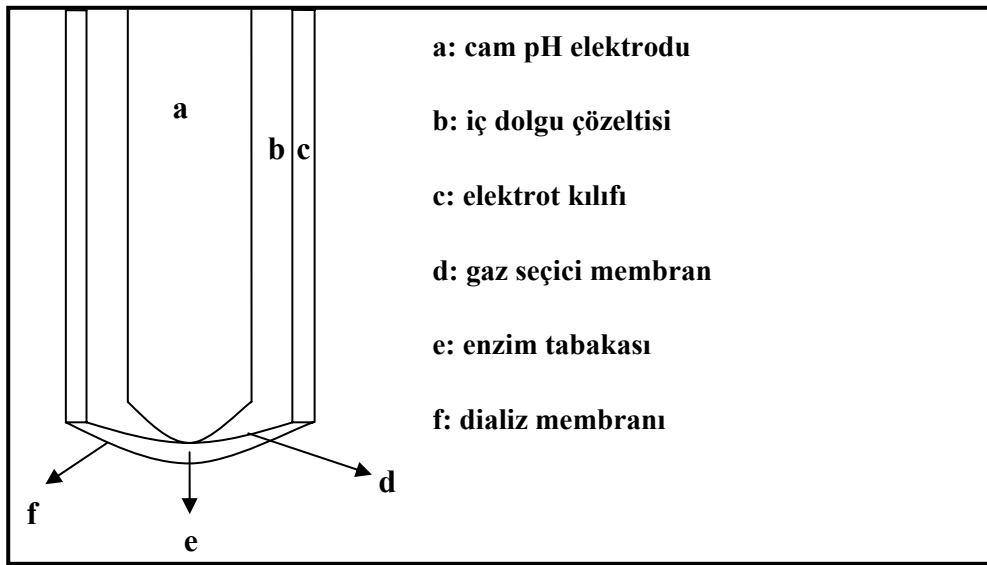
2.2.2.1 Potansiyometrik Sensörler

Potansiyometrik tip sensörde, membran (cam, katı, sıvı), seçici olarak yüklü tanecikçi membran fazın içine alır. İç kısımdaki dolgu çözeltisi ve örnek çözelti arasında potansiyel fark oluşturur. Oluşan bu potansiyel analit konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik iyon seçici elektrotlar arasında, özellikle gaz problemleri kullanışsızdır. Bu tip sensörlerde bu problem, gaz seçici membranın iyon seçici elektrot üzerine çıkarılmasıyla giderilebilir. Örnek içindeki diğer çözünmüş maddeler membrandan difüze ederek, iç dolgu çözeltisinin pH'sını değiştirebilir ve sensöre olumsuz etki yapabilir.

Potansiyometrik iyon seçici elektrotlar arasında daha ziyade gaz problemleri kullanışlıdır. Gaz problemleri, iyon seçici elektrotun gaz seçici membranla yer değiştirmesiyle yapılır. En sık kullanılan gaz seçici sensörler, amonyak ve karbondioksit sensörleridir.

Şekil 2.2'de tipik bir biyokatalitik potansiyometrik gaz probu gösterilmektedir. Elektrot, pH camından, referans elektrotlarından ve gaz seçici membrandan oluşur. Cam elektrot ve

membran arasında karbondioksit sensörü için sodyum bikarbonat çözeltisi, amonyak sensörü için amonyum klorid çözeltisi ince bir tabaka halinde bulunur. Elektrot, analizi istenen çözeltiye daldırıldığında, enzimatik reaksiyon sonucu karbondioksit veya amonyak gazı üretilir. Oluşan gaz, analizi yapılan çözeltiden pH elektrotuna doğru difüze ederken, öncelikle gaz seçici membrandan geçer ve iç dolgu çözeltisine ulaşarak burada çözünür. Çözünmeye bağlı olarak ortam pH'sı değişir ve buna bağlı olarak sistemin potansiyometrik yanıtı artar. Potansiyometrik yanıtındaki lineerlik, 10 μ M - 0,1 M substrat konsantrasyon aralığında gözlenir (Dinçkaya vd., 1994; Turner, 2000).



Şekil 2.2 Potansiyometrik gaz probu

2.2.2.2 Amperometrik Sensörler

Amperometrik sensörler, sabit akımı ölçerler. Amperometrik sensörler, çalışma elektrodu ve referans elektrot arasındaki sabit bir potansiyelde oluşan akımı monitörize eder. Bu tip sensörlerin çalışma prensibi genellikle iki elektron konfigürasyonuna dayanır. Sensör, substrat konsantrasyonuna karşı amperometrik lineer sinyaller verir. Substrat ya da üründen herhangi biri elektrot yüzeyinde elektroaktif özellikte (yükseltgenebilir ya da indirgenebilir) olmalıdır. Bu tip sensörlerin optimizasyonu oldukça zordur.

Hidrojenperoksit oksidasyonu ve oksijen indirgenmesi ölçümlerinde genellikle platin elektrotlar kullanılır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda sıkça, modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş cam karbon elektrotlar kullanılmaya başlanmıştır. Amperometrik sensörlerde, elektrot yüzeyinin yapısı kimyasal maddelerle modifiye edilerek değiştirilebilir. Bu durum

son yıllarda başlı başına bir çalışma sahası olmuştur. Modifiye elektrotlarda elektrokimyasal reaksiyon hızı yüksektir, modifikasyon işlemi sayesinde elektrot yüzeyinin çözeltideki farklı materyallerle kaplanması önlenir. Ayrıca modifikasyon sayesinde enzim immobilizasyon basamağı daha iyi kontrol edilir.

Enzim elektrotlarında redoks sağlayıcıların kullanılmasıyla elektrot yüzeyindeki protein yapılarının yavaş redoks davranışından oluşan problemlerin kolaylıkla üstesinden gelinebilir. Amperometrik sensörler için en ideal enzimler, aktif bölgeleri elektroaktif özellikte olan yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Dinçkaya vd., 1994; Turner, 2000).

2.2.3 Biyosensörde Ölçüm Metodu İçin Gerekli Analitik Hesaplamalar

2.2.3.1 Kalibrasyon Eğrisinin Lineerliği

Reaksiyon ortamına artan analit eklemeleri yapılarak elde edilen akım değişimleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilir. Belli bir konsantrasyonda analit ilavesinden sonra ortam kararlılığının bozulması, enzim aktivitesinin azalması, elektrot yüzeyinin oluşan bazı radikaliklere bağlı olarak dolması gibi nedenlerle akım değişimleri azalır ve ileriki konsantrasyonda eklemelerden sonra akım değişimi gözlenmez. Doğru ölçümün yapılabilmesi için akım değişimlerinin doğrusal eğilim gösterdiği lineer bölgeyi tanımlamak gereklidir. Biyosensör için ölçüm aralığı tanımlanan bu lineer aralıktır. Gerekli analitik hesaplamalar bu lineer aralıkta yapılır. Lineer aralığın geniş olması biyosensör için avantajdır.

2.2.3.2 Cevap Süresi

Cevap süresi biyosensör için önemli diğer bir parametredir. Reaksiyon ortamına analit eklemesi yapıldığı andan akım değişiminin olduğu ve tekrar kararlı hal akımına ulaşıldığı ana kadar geçen süre olarak tanımlanır. Hızlı cevap alma biyosensör için avantajdır. Cevap süresi, elektrot materyaline, iletken polimerin cinsine, enzimin yapısına ve hızına, analitin enzime olan ilgisine ve analitin elektrot yüzeyindeki redoks potansiyeline bağlı olarak değişim göstermektedir.

2.2.3.3 Ölçüm Metodunun Güvenilirliği

Ölçüm metodunun güvenilirliği, tekrarlanabilirlik (stabilite) ile tanımlanır. Aynı konsantrasyondaki analitin reaksiyon ortamına ard arda eklenmesiyle oluşan akım değişimleri arasındaki standart sapma değeri stabiliteyi verir. Biyosensörde ölçümün standart sapma değerinin minimuma indirgenmesi ölçümü doğruluğa yaklaştırmaktadır. Ayrıca eklenen

analitin gerçek konsantrasyon değeri ile kalibrasyona göre okunan ölçüm sonucu arasındaki fark ölçümün doğruluğunu vermektedir.

2.2.3.4 Belirleme Limiti

Biyosensörün cevap verebildiği en küçük konsantrasyon değeri belirleme limiti olarak adlandırılır. Belirleme limiti $3s_b/m$ formülü ile hesaplanır. Burada m analit için hazırlanmış kalibrasyon eğrisinin lineer bölgedeki eğimini, s_b aynı konsantrasyondaki analitin reaksiyon ortamına ardarda eklenmesiyle oluşan akım değişimleri arasındaki standart sapma değerini verir. Düşük belirleme limiti biyosensör için bir avantajdır (Hasebe ve Osteryoung, 1975).

2.2.3.5 Hassasiyet

Biyosensörün hassasiyeti, oluşturulan analit kalibrasyon eğrisinin eğimidir. Bir başka tanımla biyosensörün ne kadar küçük bir değişimi lebildiğinin ölçüsüdür. Bu sebeple, hassasiyet değerinin büyük olması konsantrasyondaki küçük bir değişimin llebildiğinin göstergesidir.

3. BİYOSENSÖR UYGULAMALARINDA KULLANILAN YENİ ELEKTROT MATERYALLERİ

3.1 İletken Polimerlerin Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı

Biyosensörler son yıllarda oldukça ilgi görmeye başlamışlardır. Bunun en önemli sebeplerinden biri biyosensörlerin, klinik tanımlama, çevresel ölçümler, gıda koruma sektörü ve biyoproses ölçümleri gibi pek çok alanda kullanılabilir olmasıdır. İletken polimerler, sol-jeller, polimerler v.b. gibi pek çok materyal; istenilen biyosensörün yapımında yer alan biyomoleküllerin stabiliteelerini arttırmada kullanılmışlardır (Gerard vd, 2002; Kim ve Lee, 2003; Liu vd., 2006; Rajesh vd., 2009; Zejli vd., 2008).

Polimerler, uzun zincirli moleküllerdir. Bunlara makromolekül de denmektedir. Monomer denen çok sayıda daha basit birimlerin birbirine eklenmesiyle yapılırlar. Polimerlerin hem organik hem de inorganik şekilde son derece geniş bir yayılım alanı vardır. Selüloz, linyit, proteinler veya nükleik asitler organik polimerlerin tipik örneklerindendir. Elmas, kuartz, feldispat gibi bazı maddeler de inorganik polimerlere birer örnek teşkil ederler. Bu maddelere ilave edilmesi gereken polietilen, poliüretan, polikarbonat vb. gibi önemli sayıda birçok sentetik polimerler de vardır. Sentetik polimerlerin sayısı ve çeşitliliği çoğalmaya devam ettikçe, bunların değişik tekniklerle araştırılması ve incelenmesi de bitmeyecektir. İletken polimerlerin yapısını araştırmak için sıkça kullanılan bu metotlardan biri de Elektron Paramanyetik Rezonanstır (EPR). Sadece paramanyetik merkezleri açığa vurma özelliğinden dolayı, EPR tekniği bu tarz incelemeler için gayet uygun bir yöntemdir. Makromoleküllerin iki elektronlu kimyasal bağlarının kırılmasıyla oluşturulan bozukluklar paramanyetik serbest radikallerdir. Bunlar, mekanik öğütme, çeşitli kimyasal ajanların etkisi, iyonize edici ışınlama, gama ve ultraviyole ışınlaması gibi birçok yöntemlerle oluşturulabilirler. Bu teknikle, polimerlerde serbest radikallerin araştırılması, molekül zincirlerinin kırılmasıyla irtibatlı olan yaşlanma, kimyasal ajanların etkisi veya ışınlamaya maruz kalma gibi farklı süreçlerin anlaşılmasında çok kullanışlıdır (Malhotra vd., 2006).

Genellikle, serbest radikaller, zayıf bir spin-yörünge etkileşmesine sahip olmalarından dolayı, serbest elektronunkine yakın g-faktörü ile karakterize edilirler. Aynı zamanda, serbest radikallerin EPR spektrumları genellikle iyi çözölmüş aşırı ince veya süper aşırı ince yapı yarılmaları gösterir. Bu yarılmalar, araştırılan radikallerin kimyasal yapılarını yansıtarak onların daha iyi tanınmasını imkân verirler. Diğer yandan, yüksek mertebede düzenli olan polimerler de tipik kristal katı olmamakla birlikte camsı (glassy) duruma benzer bazı

özellikler gösterirler.

Araştırmacılar, daha ucuz malzeme üretmek için çalışmalarını sürdürmektedirler. Nitekim çok uzun bir geçmişi olmayan naylon, lâstik, plâstik ve polivinilklorür (PVC) bugün çok yaygın olarak kullanılan maddeler sırasına girmiştir. Çevremizde gördüğümüz, günlük hayatta kullandığımız pek çok şey polimerlerden yapılmıştır. Polimerler (poly= çok, meros=parça, ünite), birbirine benzer küçük molekül birimlerinin zincir şeklinde birbirine eklenerek meydana getirdiği dev moleküllerdir. Çok sık kullandığımız naylon poşetlerden, araba lâstiklerine; çocuk oyuncaklarından, kışın giydiğimiz botların tabanlarının yapımına kadar, pek çok sahada polimerler kullanılmaktadır.

Polimerler, metallerin aksine yalıtkan ve elektriği iletmeyen maddeler olarak bilinmekteydi ve bu özelliği ile de elektrik tellerinin kaplanmasında kullanılmaktaydılar. Çünkü böylece elektrik tellerinin canlılarla ve birbirleriyle kısa devre teması önlenmekteydi. Ancak, bütün bunlarla birlikte Alan J. Heeger, Alan G. MacDiarmid ve Hideki Shirakawa yaptıkları çalışmayla bir polimer olan poliasetilenin (polyacetylene) hemen hemen bir metal gibi iletken olabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada polimerlerin sadece yalıtkan olma özelliğine sahip olmadığı gösterilmiştir (Malhotra vd., 2006).

Poliasetilen, Shirakawa ve arkadaşları tarafından 1974'te, Ziegler Natta katalizini kullanarak, asetilenden gümüş renkli, parlak görünümlü bir film hazırlayana kadar siyah bir toz olarak bilinmekteydi. Fakat poliasetilen, metalik görünümüne rağmen henüz bir iletken değildi. Bununla birlikte, 1977'de, Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger klor (chlorine) brom (bromine) veya iyot (iodine) buharı ile yükseltgenme (oxidation) yaptırdıkları polimer filmlerinin, orijinal hallerinden, 109 kez daha iletken olduklarını bulmuşlardır. Polimerlerin halojenlerle muamelesi yarı iletkenlerdekine benzer biçimde “katkılama” (doping) olarak isimlendirilmiştir. Poliasetilenin “katkılı” hali metre başına 105 siemens'lik bir iletkenliğe sahiptir. Bu da daha önce bilinen polimerlerinkinden epeyce yüksek bir değerdir. Bir kıyaslama yapacak olursak, iyi bir yalıtkan olan teflonun iletkenliği 10^{-16} Sm^{-1} iken ve gümüş ile bakırınki 10^8 Sm^{-1} 'dir (Malhotra vd., 2006).

İletken bir polimerin temel özelliği polimerin omurgası (ana zincir) boyunca konjuge (ardışık sıralanmış) çift bağların olmasıdır. Konjugasyonda, karbon atomları arasındaki bağlar birbiri ardı sıra değişen tek ve çift bağlar şeklinde dizilmişlerdir. Her bir bağ kuvvetli bir kimyasal bağ olan “sigma” (σ) bağı içerir. İlaveten, her çift bağda daha zayıf (% 30) ve daha az lokalize olmuş bir “pi” π bağı vardır. Bunlara rağmen, konjugasyon, polimer maddeyi iletken yapmak

için yeterli değildir. Fakat bunlara dopant maddeleri girilerek iletkenliği artırılabilir. Dopantların yaptığı şey malzeme içerisinde elektron ve “hole” lerin sayısını arttırmaktır. Bir elektron eksikliğinin olduğu konuma bir hole denir. Böyle bir “hole” komşu bir konumdan atlayan bir elektronla doldurulduğunda yeni bir hole oluşturulur ve bunun böyle devam etmesiyle yükün uzun bir mesafeye göç etmesi sağlanır (Gerard vd., 2002).

İletken polimerler organik ve inorganik elektriksel iletkenlerin daha eski, daha geniş bir grubunun bir alt-grubudur. 1970’in başlarında, çok düşük sıcaklıklarda ($T_c = 0.26$ K) süperiletken olan inorganik patlayıcı polimer, polisülfür nitrit (SN)_x bulunmuştur. Bundan başka bu zamana kadar daha birçok iletken organik polimer çalışmaları da yapılmıştır. Bunlarla birlikte, bu yeni araştırma alanını gerçek anlamda ilk defa başlatan iletken polimer poliasetilenidir. (Greene vd., 1975).

1958 yılında, Natta ve arkadaşları, $\text{Et}_3\text{Al}/\text{Ti}(\text{OPr})_4$ (Et = etil, Pr = propil) katalizörünü kullanarak asetileni hekzan içerisinde polimerleştirmişler ve böylece poliasetilen polimerini elde etmişlerdir. Bu oluşan madde yüksek derecede kristalimsi ve düzenli yapısına rağmen, siyah, havaya duyarlı, kaynaşmaz ve çözünmez bir tozdur. Ziegler-Natta polimerleşmesi, etilen gibi alkenlerin polimerleşmesi için, büyüyen makromolekülün karbon-titanyum bağına doymamış bir molekül eklenerek geliştirilmiştir. Bu süreç büyük ölçüde kataliz sistemin seçim aktivitesine bağlıdır. 1970’lerin başlarında Shirakawa ve çalışma arkadaşları poliasetilenin iyi tanımlanmış filmlerini yapma imkânı veren bir metot uyarlamışlardır (Malhotra vd., 2000, Gerard vd., 2002).

Shirakawa, bu polimerleşmenin, inert bir çözücüde katalizör sisteminin konsantre çözeltisinin yüzeyinden etkilenebildiğini göstermiştir. Bu sentetik prosedür inert bir atmosfer altında toluenin küçük bir hacmine önce $\text{Ti}(\text{OBu})_4$ ve sonra da Et_3Al ’nin ilave edilmesini kapsamaktadır. Bu çözelti 20 °C lik bir sıcaklıkta 45 dakika bekletilmiş ve bundan sonra -78 °C’ye kadar soğutulmuştur. Reaksiyon kabı boşaltılmış, sonra asetilen gazı verilmiş ve bunun, reaksiyon kabının duvarları üstünde oluşan kataliz filmi ile reaksiyona girmesi sağlanmıştır. Burada hemen bir poliasetilen filmi oluşmuştur. Reaksiyon, reaksiyona girmemiş asetilen gazının boşaltılmasıyla kontrol edilmiştir. Bu prosedür sonucunda bakır renkli bir all-cis-poliasetilen elde edilmiştir. Shirakawa’nın bu prosedürü, reaksiyon 150 °C de n-hexadecane çözücüsünde yapılarak, tekrarlanmış ve gümüş renkli all-trans- poliasetilen elde edilmiştir. İletkenlik değerleri : cis-poliasetileninki $10^{-8} - 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$ civarında ve trans-poliasetileninki ise $10^{-3} - 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Gerard vd., 2002).

1975 yılında, kovalent inorganik polimerlerin (SN)_x metalik özellikleri incelemişlerdir. Shirakawa ve Ikeda daha önceden gümüş renkli poliasetilen filmlerinin bromür veya klorür ile muamele edilmesinin (işleme tabi tutulmasının) renk değiştirmeksizin infrared geçişini azalttığını görmüşlerdir. Bu çalışmada iyodürle işleme tabi tutulmuş trans-poliasetilen için 3000 Sm⁻¹ lik bir iletkenlik değeri bulunmuştur. Bu da katkısız materyallere göre yedi kat mertebesinde büyük bir artış demektir. Cis-poliasetilen, katkılamayla daha yüksek iletkenlikler bile gösterebilmektedir. İyodürle, polimer ilk defa, all-trans polimere izomerleştirilmiştir. Katkılamayla böyle bir etkinlik (serbest bozukluk) kazanan katkılanmış poliasetilendeki yönelimin derecesi bir uçtan bir uca daha büyük olmuştur. AsF₅ ile katkılanması cis-poliasetilenin iletkenliğinde 10¹¹'lik bir çarpan kadar artışa sebep olmuştur. Bu çalışmalarla iletken polimerlerin varlığı kanıtlanmıştır (Greene vd., 1975).

1980'nin başlarından beri geniş olarak çalışılan başka polimerler de mevcuttur. Bunlar polipirol, politiyofen (ve çeşitli politiyofen türevleri), polifenilenvinil ve polianilin polimerleridir. Bunlar içinde en çok poliasetilen kristalimsi iletken polimer olarak gözükür, fakat ticari olarak yapılacak iletken polimerler içinde birinci sırada değildir. Çünkü poliasetilen havadaki oksijenle kolaylıkla okside (yükseltgenebilir) olabilir ve neme de duyarlıdır. Polipirol ve politiyofen, poliasetilenen önemli ölçüde farklıdır. Çünkü bunlar katkılı biçime doğrudan sentezlenebilir ve havada çok kararlıdır. Bunların iletkenlikleri düşük, yani 10⁴ Sm⁻¹ civarındadır, fakat bu da birçok pratik amaçlar için yeterli büyüklüktedir (Gerard vd., 2002; Rajesh vd., 2009).

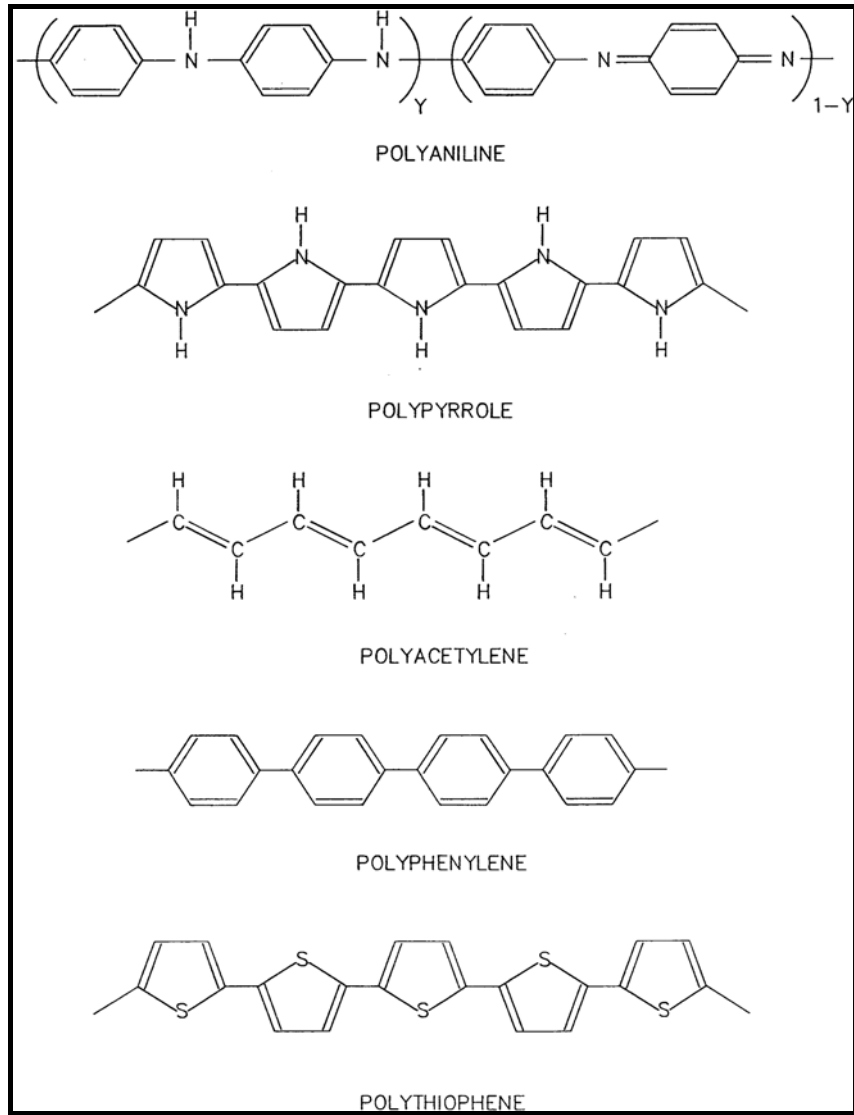
Doymuş polimerlerle karşılaştırıldığında, iletken polimerlerin farklı elektronik yapıya sahip oldukları görülür. İletken polimerler, elektriksel iletkenlik, görsel olarak düşük enerji değişimi, düşük iyonizasyon potansiyeli ve yüksek elektron eğilimi gibi farklı elektronik özelliklere sahip olan π -elektron belkemiği içerir. İletken polimerlerdeki bu genişletilmiş π -birleşik sistemi, polimer zinciri boyunca değişen tek ve çift bağlara sahiptir.

İletken polimerlerle ilgili yapılan çalışmalar, 1975 yılında ,düşük sıcaklıkta oldukça iletken bir hale dönüşen poli(sülfür nitrit) [(SN)_x]'in keşfinden sonra hız kazanmıştır (Greene vd.,1975). Poli-parafenilenin Ivory ve arkadaşları tarafından 1979 yılında sentezlendiği bildirilmiştir (Rajesh vd., 2009; Malhotra vd., 2000). Bu polimer hem n hem de p tipi dopantlar içeren yüksek iletken şarj transfer kompleksi yapısındadır. PPS ilk esnek iletken polimerdir. Ticari olarak kullanılan iletken plastiklerin sağlanmasına bir ışık tuttuğu için, bu polimerin keşfi oldukça heyecan verici bulunmuştur (Gerard vd.,1980).

Polipirol (Ppy) başlıca araştırılan iletken polimerler arasında gelmektedir. Polipirol ilk olarak 1912 yılında konvansiyonel kimyasal metotlarla sentezlenmiştir. Pirolün sulu H_2SO_4 ile elektrokimyasal oksidasyonu platin elektrot üzerinde gerçekleştirilebilmiştir. Bu ürün aynı zamanda “Pyrrole Black” olarak da bilinmektedir. İletkenliği 100 Scm^{-1} ve mükemmel bir hava kararlılığına sahiptir (Malhotra vd., 2000; Rajesh vd., 2009). Fakat bu ürünün en büyük dezavantajı hiçbir organik çözücünde çözünememesidir. Günümüzde PPy filmleri oda koşullarında 1000 S/cm iletkenliğine sahip olarak hazırlanabilmektedir.

İletken polimerleri, diğer polimerlerden ayıran temel özellik, sırayla değişen tek ve çift bağlardan oluşan bir zincir yapısına sahip olmalarıdır. Bu şekilde sırayla değişen bağ yapısına; "konjügasyon" denir. Dolayısıyla sadece konjüge olmuş polimerler elektriği iletebilir. Poliasetilen, bunun en güzel örneğini teşkil etmektedir. Polimerde, iletkenliğin sağlanabilmesi için; yük taşıyıcılarının hem konsantrasyonları, hem de hareket etme kabiliyetleri yüksek olmalıdır. Bunu sağlayabilmek için; yukarıda bahsettiğimiz gibi dopantlar kullanılmaktadır. Eğer, dopant kullanılmazsa, sadece termal uyarılmayla, yeni yük taşıyıcıları oluşmaktadır. Ancak bu sefer de, bu yük taşıyıcılarının konsantrasyonu çok düşük olmaktadır ve bu tür polimerlerin iletkenliği yalıtkanlardakine yakın olmaktadır. Bundan dolayı konjüge polimerlerin iletkenliği 10^{-10} S/m'den , 10^7 S/m'ye kadar geniş bir aralıkta değişebilmektedir (Gerard vd., 2002; Abu- Rabeah vd., 2005; Rajesh vd., 2009).

Ayrıca poli(3,4- etilendioksitiyofen)(PEDOT), polifuran, poliindol, polikarbazol, polianilin v.b. gibi diğer pek çok iletken polimer türü sentezlenmiş ve geniş bir şekilde çalışılmıştır (Malhotra vd., 2000). Yaygın olarak kullanılan bazı tipik iletken polimerlerin yapıları Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Geetha vd ilaç sanayinde iletken polimerlerin uygulamalarını araştırmışlardır (2002). Andreescu ve Sadık iletken polimerlerin çevresel ve klinik ölçümlerde kullanılmasında yeni yöntemler ve karşılaşılan güçlüklerle ilgili özet bir araştırma sunmuşlardır (2004).



Şekil 3.1 Biyosensörlerde kullanılan bazı iletken polimerlerin yapıları (Gerard, M.,2002)

İletken polimerler arasında politiyofen çeşitli özellikleri nedeniyle özel bir yere sahiptir. Bunlar; doplanmış ve doplanmamış halde çevre stabilitesinin yüksek oluşu, elektriksel özellikleri, non-lineer optik özellikleri ve yüksek tersinir özellikte redoks açıcısı olmalarıdır. Buna ilaveten tiyofen çeşitli polimerizasyon metotlarının kullanılmasına ve farklı yan fonksiyonel grupların ilavesine imkan sağlayacak esneklikte bir kimyasal yapıya sahiptir. Literatürde farklı kimyasal yapıda şekillendirilmiş ve üzerinde epoksi grubu bulunduran çeşitli polimerler bulunmaktadır. GMA kopolimerleri ve epoksi grubu taşıyan metakrilat monomeri ve diğer akrilik ve vinil monomerleri bunlara örnek olarak gösterilebilirler. Epoksit 3'lü halkalı ether yapısı nedeniyle bir çok kimyasal reaksiyonda halka açılması reaksiyonuyla değişikliğe uğratılabilmektedir. Bu şekilde kopolimerlerin kimyasal modifikasyonu sağlanabilmekte, elde edilen kopolimerler enzimlerin, DNA, çeşitli

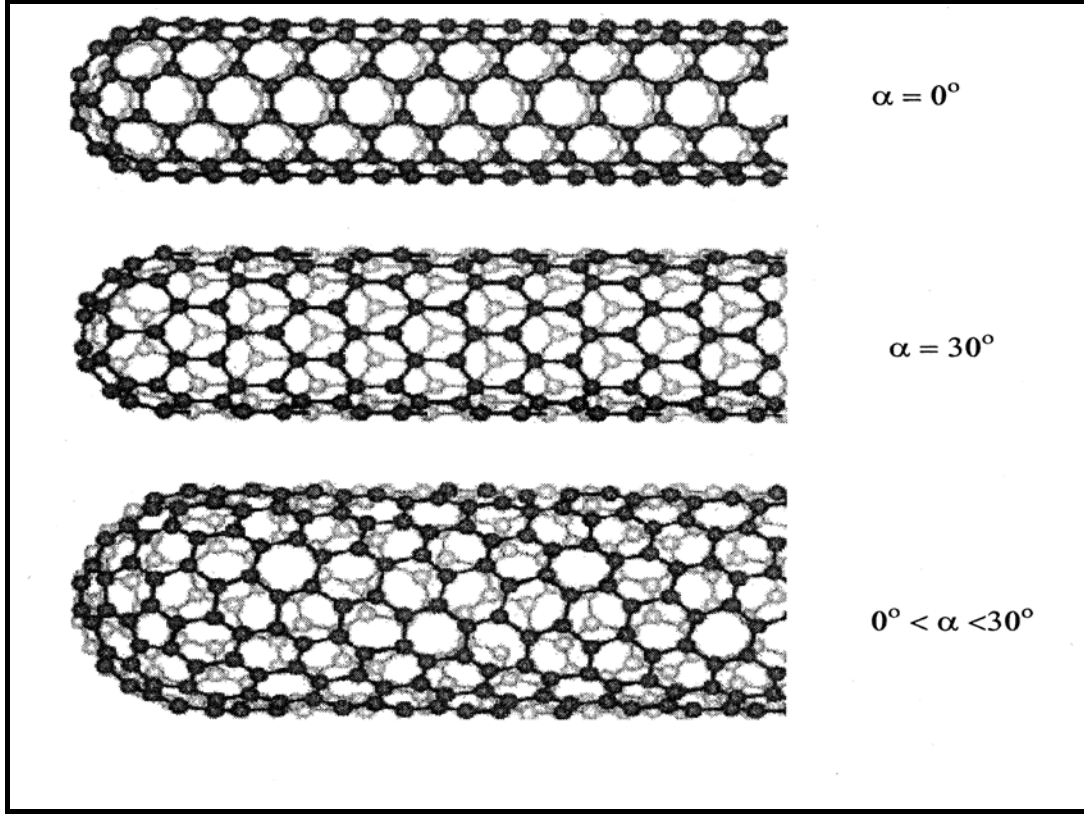
katalizörler ve biyomoleküllerin immobilizasyonu gibi farklı uygulamalara elverişli hale gelmektedir. Kopolimerizasyon işlemi, polimer özelliklerinde sistematik değişiklikler elde edilebilmesi açısından en etkili ve başarılı yoldur. Ağır deneysel koşullar gerektirmez. Çok sayıda monomere uygulanabilmekte ve yeni özellikte malzeme elde edilmesini sağlamaktadır. Reaktif fonksiyonel polimerler üzerinde yan reaktif fonksiyonel gruplar içeren akrilat ve metakrilat monomerlerinin katılımıyla hazırlanabilmektedir (Yılmaz vd., 2004; Yılmaz vd., 2005). Bu çalışmada elektroaktif 3- metiltienilmetakrilat (MTM) ve GMA monomeri tesadüfi kopolimerizasyona tabi tutulmuş ve serbest radikal polimerizasyon reaksiyonu ile yeni bir kopolimer elde edilmiştir. Elde edilen kopolimer tezdeki denemelerde kullanılmıştır.

3.2 Karbon Nanotüp ve Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı

Keşfi tarih öncesine dayanan bir element olan karbonun doğada geniş bir dağılımı mevcuttur. Karbon atomu kendisiyle ve diğer atomlarla sonsuz değişken halka ve zincir bağlanması vasıtasıyla bağ oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Yüzyıllardır, dünyada elemental karbonun allotroplarından meydana gelen iki formu olduğu bilinmekteydi. Bunlar yumuşak, iletken bir yapıya sahip olan grafit ve sert,yalıtkan elmasdır. Ancak, 1986 yılında Rice Üniveritesinden R.E.Smalley tarafından yapılan araştırmalarda bunun yanlış olduğu kanıtlanmıştır. Bu araştırmalara göre, bir futbol topuna benzeyen muhteşem bir küresel yapıda düzenlenmiş, beşgen ve altıgen yapılar içeren ve C60 molekülü (Şekil 3.4) olarak adlandırılan , üçüncü bir karbon allotrobu olduğu bulunmuştur(Smalley, 1986). C60 molekülünün Smalley tarafından geliştirilen ürerim metodu Wolfgang Kratscher ve Donald Huffman tarafından oldukça basitleştirilmiştir. Bu üretim metodu Japon bilim adamı Iijimanın dikkatini çekmiş ve C60 molekülünü ,eş merkezli biçimde bağlantısız silindirler şekline getirerek ,çok duvarlı karbon nano tüp (MWCNT) olarak ta bilinen yeni bir molekül keşfetmiştir.(Iijima, 1991) Bundan iki yıl sonra ise grafinin tek katmanlı silindirler biçiminde yuvarlanmasıyla tek duvarlı karbın nano tüpler (SWCNT) elde edilmiştir. Grafitten "arc-discharge" buharlaştırma yöntemiyle elde edilen tüpler, grafit plakasının kıvrılarak silindir şekline gelmesiyle içi boş boru halini almıştır (Agui, 2008).

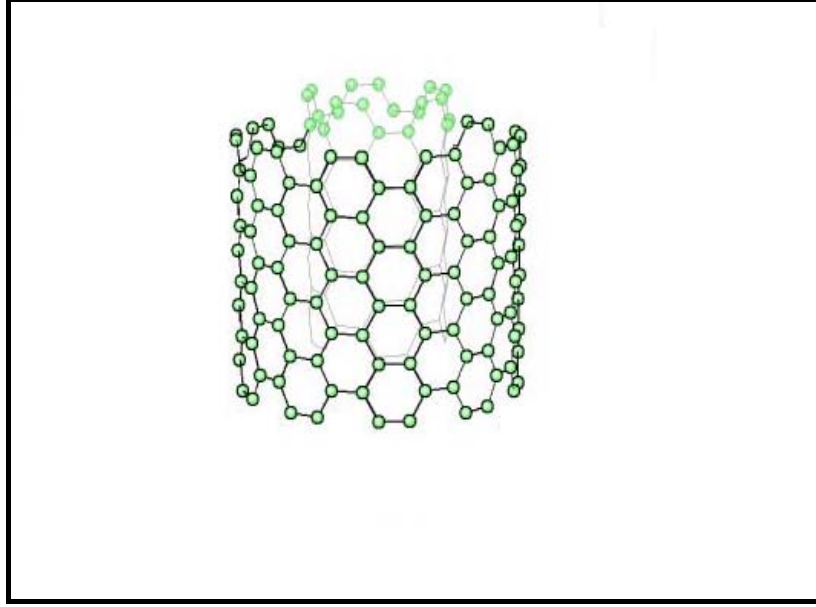
Karbon nanotüpler, geometrilerine bağlı olarak yarı-iletken ve metalik özellik gösterirler. Hiç bir katkı maddesi olmaksızın, nanotüpün, geometrik parametrelerinin değiştirilmesiyle, elektronik özellikleri de değiştirebilir. Tüplerin elektronik uygulamalarda, önemli bir yeri vardır. Çok esnek ve sağlamdırlar. Küçük çaplı (yaklaşık 1-2 nanometre) tüplerden oluşturulmuş bir demeti, koparabilmek için uygulanan çekme kuvveti, yaklaşık 36

gigapaskaldır. Buna göre, nanotüp fiberler, gerilmeye karşı en sağlam malzeme özelliğini taşımaktadır. Nanotüp yapıda, grafit plakalarında olduğu gibi sadece altıgen şekiller bulunmaktadır (Tsai vd, 2007; Agui vd., 2008).



Şekil 3.2 Tek duvarlı karbonanotüp (SWCNT) yapısı

Karbon nanotüpler, önemli yapısal, mekaniksel ve elektronik özellikler gösteren yeni nanomateriyallerdir; yüksek elektrokimyasal aktiviteleri biyosensor ve elektrokimyasal uygulamalar için çok önemlidir (Tsai vd., 2007). Bu sebeple elektrot materyali olarak kullanılabilirler ayrıca yapıları nedeniyle birçok biyomolekülün immobilizasyonuna da olanak tanırırlar (Agui vd., 2008). Elektrot materyali olarak, karbon nanotüpler elektrot ve elektro aktif türler arasındaki elektron transferini kolaylaştırdığından, kimyasal sensör ya da biyosensörlerde etkin bir rol oynar. Hem tek duvarlı (SW) hem de çok duvarlı (MW) karbon nanotüplerin bu özel durumları elektrokimyasal sensör alanında birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir (Şekil 3.2, Şekil 3.3). SWCNT, nano boyutunda çap içerir ve tek silindirik grafit tabakadan oluşur. Bugüne kadar kaydedilen en küçük çap 0,4 nm olmasına rağmen genellikle 1 nm' lik yüzey çapına sahiptirler. Bunlar arm-chair; zig-zag ve chiral yapıda olabilmektedirler. MWCNT ler ise yaklaşık 10 tane silindirden oluşur. Boşluklar 0,3-0,4 nm düzeyindedir. MWCNT ler 2–100 nm çapa sahiptir (Rivas vd., 2007).



Şekil.3.3 Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) yapısı

Belirli bir moleküler zemin altında karbon nanotüpün en özellikleri şu şekilde açıklanabilir.

Kimyasal Reaktivite Bir karbon nanotüpün kimyasal aktivitesi, CNT yüzeyinin eğrilik derecesinin direk bir sonucudur. Eğrilik derecesinin artması pi- orbital uyumsuzluğuna neden olmaktadır. Bu durum CNT'lerin reaktivitesiyle doğrudan ilişkilidir. Daha küçük çaplı bir nanotüp kullanılarak reaktivitenin artırılması mümkündür. Kovalent kimyasal modifikasyon, CNT'nin 2 yan duvar ya da gösterilen son kapağa sahip olması durumunda mümkündür. CNT'lerin çözünürlüğünü farklı çözücülerde bu yolla kontrol etmek mümkündür.

Elektriksel İletkenlik

Küçük çaplı karbon nanotüpler yarı iletken ya da metaliktir. İletim özelliklerindeki farklılıklara moleküler yapı sebep olur. Sonçta farklı bir bant yapısı ve böylece farklı bir bant aralığı oluşur.

Optik Aktiflik

Araştırmalar nanotüplerin geniş olması durumunda optik aktifliğinin kaybolabileceğini ortaya koymuşlardır.

Mekanik Dayanıklılık

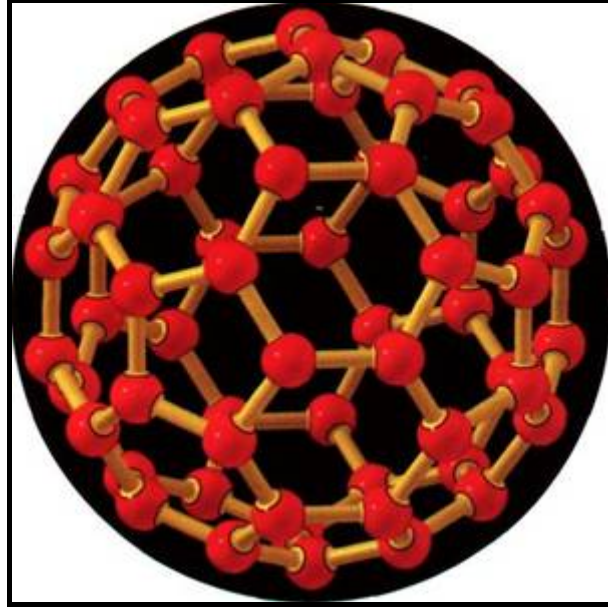
CNT'ler eksen doğrultusunda bir çok geniş geniş modüllere sahiplerdir. Nanotüpler bir bütün

olarak boyca uzun oldukları için çok esnektirler. Bu nedenle potansiyel uygulamalarında kullanılmak için oldukça uygun materyallerdir.

Karbonun sp , sp^2 ve sp^3 hibritleşmesinin üçünü de yapabilmesi çok sayıda allotrobunun olmasına neden olur. Bu üç bağlanma şeklini yapabilen tek element karbondur. Düzgün Karbon nanotüp yapılarında, atomlar, birbirleri ile sp^2 şeklinde (Grafit plakada olduğu gibi) bağlanmaktadır. Atomlar sadece altıgen geometri oluşturmakta ve her atomun sadece üç komşusu bulunmaktadır. Karbon tüplerin, makroskopik büyüklüklerde oluşmaları mümkün ise de, bunlar çok kırılmandır. Ancak nanometre boyutlarına sahip tüpler, çok esnek ve sağlamdır.

Karbon nanotüplerin, elektronik malzeme olarak manyetik ve optik nanoaygıt yapımında; ayrıca hafıza elemanı, kapasitör, transistör, diyot, biyosensör, mantık devresi ve elektronik anahtar yapımında kullanım alanları bulunmaktadır. Bunların yanında Karbon nanotüpler, bilinen en sağlam malzeme olma özelliğine sahiptir. Hasarsız bir Karbon nanotüp, kendi ağırlığının 300 milyon katı bir ağırlığa dayanabilecek sağlamlıktadır. Bu sağlamlıkta başka bir malzeme yoktur. Karbon nanofiberler, çok geniş yüzey alanına sahiptir. Nanofiberin kütlesiyle alanı arasındaki oran, normal malzemelere göre çok büyüktür. Örneğin kütlesi 1 gr. olan bir Karbon nanotüp fiberin alanı, 300 m^2 yi bulabilmektedir (Zhao vd., 2002).

Karbon nanotüp fiberlerin bu özelliği sayesinde, nanometre düzeyinde süper kapasitörler; dolayısıyla da yapay kas üretimi mümkün olabileceği düşünülmektedir. Hidrojen depolamaya da olanak sağlayan geniş yüzey alanı, karbon nanotüp fiberleri, potansiyel enerji depolama malzemesi haline getirmektedir. Karbon nano çubuklar ise, içi tamamen veya kısmen dolu tüp yapılardan oluşmaktadır. İç içe geçmiş karbon tüplerinde (çok duvarlı tüplerde), iki tüp arasındaki uzaklık, genellikle tüpü oluşturan karbon atomları arasındaki bağ uzaklığından fazladır. Eğer iç içe geçmiş tüplerde, tüplerin duvarları arasındaki uzaklık, karbon atomlarının bağ yapmalarına olanak verecek kadar azsa ($< 0.15 \text{ nm}$), karbon atomları birbirleriyle (sp^3 gibi), bağlanır. Başka bir deyişle, her karbon atomunun, dört bağlı komşusu bulunmaktadır. Bu durumda oluşan çok duvarlı tüp yapısına, çubuk adı verilmektedir. Bu yapıların esnekliği, tüplere göre daha azdır. Ayrıca tek duvarlı tüplerden farklı mekanik ve elektronik özellikler gösterirler (Zhao vd., 2002; Tsai vd., 2007).



Şekil 3.4 C60 molekülünün şematik gösterimi

Grafitin, bal peteğini andıran karbon nanotüpler; elektrik iletkenliği, esneklik, saydamlık ve dayanıklılık gibi özellikleri olan mükemmel bir yapıdır. Karbon nanotüpler, o kadar küçüktür ki, bunların trilyonlarcası bir araya getirilerek, geniş çelik yüzey veya ip gibi işe yarar bir nesne yapılabilmektedir. Dayanıklılık, esneklik gibi fizikî ve kimyevî özellikleri yanında; dış veya iç cidarlarının, atom veya molekülleri soğuracak özellikler taşıması, karbon nanotüplerini daha kullanışlı hâle getirmektedir (Agui, 2008).

Karbon nanotüpler kullanılarak üretilen levhalar; ışık yayan organik ekran, gürültüsüz elektronik sensor, sentetik kas ve yüzeylerde desen oluşturma gibi birçok alanda kullanılabileceği belirtilmektedir. Uzun bir nanotüpte, suyun farklı davranışlar sergilediği ve sıfırın altındaki sıcaklıkta dahi donmadığı ortaya çıkarılmıştır. Benzer olay, doğal bir şekilde; bitkinin kılcal köklerinden bitkiye su taşınırken gerçekleşmektedir (Tsai, 2007).

Yine karbon nanotüpler kullanılarak, su içindeki nano ölçekteki mikropları ve petrolden de ağır hidrokarbonları ayıştıran bir filtre geliştirilmiştir. Tamamen nanotüpler kullanılarak geliştirilen filtre, silindirik yapı korunarak gerçekleştirilmiştir. Karbon silindirik nanotüp kullanımı, filtreleri, dayanıklı ve kolayca temizlenir kılmaktadır (Agui, 2008).

Araştırmacılar, nanoelektro-mekanik cihazları, virüsleri ortaya çıkarmak üzere kullanmaya başlamışlardır. Nanotel alan-etki transistörü ile, grip virüsü gözlenebilmiştir. Onlarca virüsü aynı anda algılayabilecek cihazlar, geliştirilmeye çalışılmaktadır (Agui, 2008).

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.1 Kimyasal Ve Aparatlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallardan, gluteraldehit (%25), Merck'ten, lityum klorid, N,N-dimetil formamid (DMF), α,α' -Azobisisobutyronitril (AIBN), potasyum fosfat, asetik asit, sodyum asetat Merck'den, fenol, *p*-benzokinon, hidrokinon, 2,6-dimetoksifenol, 2-klorofenol, 3-klorofenol, 4-klorofenol, 2-aminofenol, 4-methoksifenol, pyrokatekol, guaiakol (2-metoksifenol), *m*-kresol, *o*-kresol, *p*-kresol, katekol, 4-asetamidofenol, pyrogallol, 2, 4-dimetilfenol, pirol (%99), sodyum dodesil sülfat (SDS), 1-cyclohexyl-3(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-*p*-tolueno-sulfonat Sigma'dan, tyrosinaz (E.C.1.11.1.7) Fluka'dan, çok duvarlı karbon nanotüp (MCNT-COOH) Nanocs. Inc.'den temin edilmiştir.

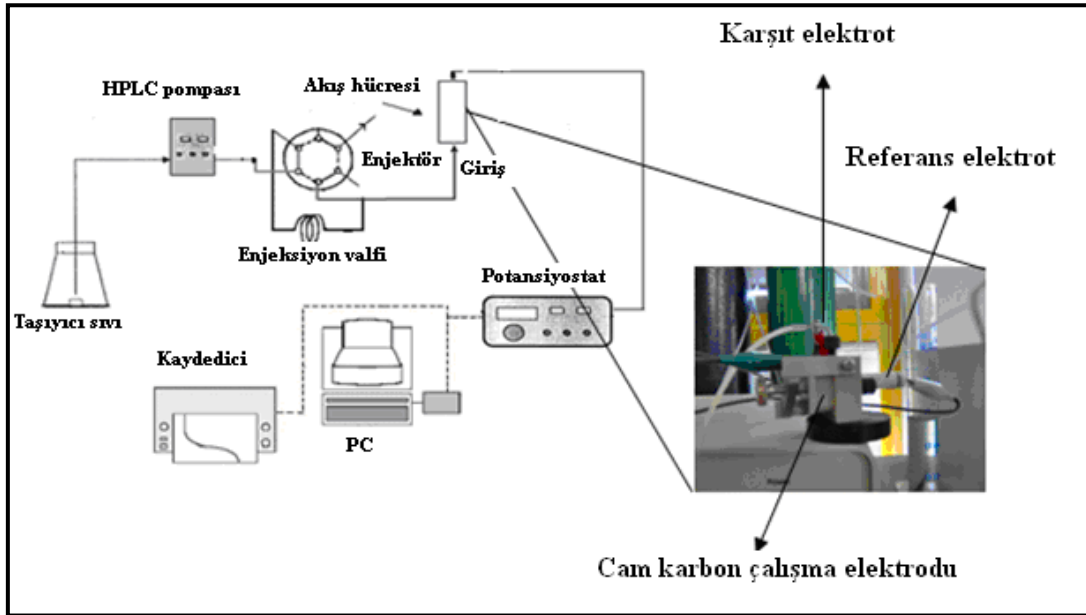
Elektrokimyasal ölçümler CHI 800B Marka ve AMEL 7050 Marka potansiyostatlar kullanılarak yapılmıştır. Altın çalışma elektrodu (2 mm çapında) veya cam karbon çalışma elektrodu (3 mm çapında), platin karşıt elektrot ve Ag/AgCl (3M NaCl) referans elektrottan oluşan konvansiyonel üçlü elektrot sistemi CH Instruments firmasından temin edilmiştir.

4.2 Deneysel Düzenekler

4.2.1 Sürekli Sistem Deney Düzeneği

Sürekli sistem deney düzeneği bir potansiyostattan, 1 cm³'lük enjeksiyon valfinden (Shimadzu), HPLC pompasından (GBC LC 1150) ve çapraz akışlı cam karbon elektrot akış hücresinden (CHI 130) oluşmaktadır (Şekil 4.1). Akış hücresi içinde bulunan cam karbon elektrot yüzeyinde farklı elektrokimyasal metotlar kullanılarak kompozit iletken polimerler yapılmış ve bu polimerler üzerine *tyrosinaz* enzimi immobilize edilmiştir. 0.1 M - pH 7 fosfat tamponu (K₂HPO₄-KH₂PO₄ taşıyıcı sıvı) sürekli sistemden HPLC pompası vasıtasıyla farklı akış hızlarında geçirilmiştir. Deneysel çalışmaların amacına göre, farklı fenol türevleri değişik konsantrasyonlarda enjeksiyon valfi yardımıyla sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon valfinde toplanan 1 cm³'lük fenolik çözelti taşıyıcı ortama karışarak, çapraz akışlı cam karbon elektrot akış hücresine ulaşmış ve hücre içerisindeki çalışma elektrodunda bağlı bulunan enzimle reaksiyona girmiştir. Reaksiyona bağlı olarak oluşan akım değişimleri potansiyostatta pikler şeklinde gözlenmiştir. Belli bir çalışma potansiyelinde potansiyostat üzerinden elektrik sinyallerine dönüştürülen tepkiler (pik oluşumları), enjekte edilen fenolik miktarlarıyla doğru orantılı olarak değişim göstermiştir. Bu akım değişimlerinden yararlanılarak, enjekte edilen fenolik konsantrasyonuna karşı akım değişimleri grafiğe

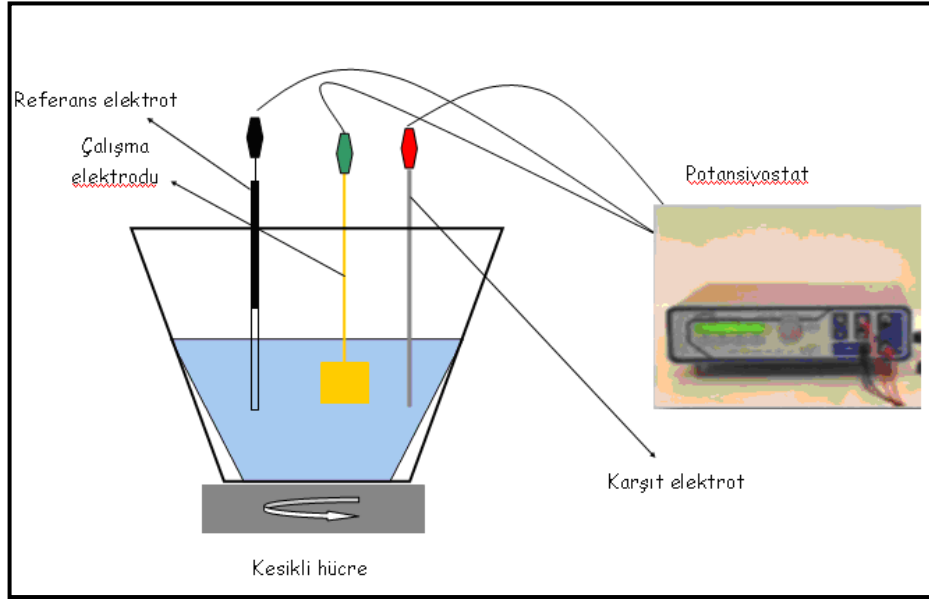
geçirilmiş, böylelikle ölçüm için gerekli kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Sürekli sistemde kullanılan elektrotlar; cam karbon çalışma elektrodu, pilatin karşıt elektrot ve Ag/AgCl (3 M) referans elektrottur.



Şekil 4.1 Sürekli sistem deney düzeneği

4.2.2 Kesikli Sistem Deney Düzeneği

Kesikli sistem, bir reaksiyon hücresi içerisine daldırılmış üçlü elektrot sisteminden oluşmaktadır. Kesikli sistemde hazırlanmış çalışma elektrodu sürekli sistemdeki prosedürlere göre yapılmıştır. Enzim tutuklu çalışma elektrodu ile birlikte, referans elektrot ve karşıt elektrot hücreye daldırılarak sisteme sabit bir elektrik potansiyeli uygulanmıştır. Belli hacimde 100 mM, pH 7,0 fosfat tamponu içeren hücreye farklı konsantrasyonlarda fenolik çözeltiler eklenerek reaksiyon sonucu oluşacak olan akım değerleri ölçülmüştür (Şekil 4.2). Bu akım değişimlerinden yararlanılarak, enjekte edilen fenolik konsantrasyonuna karşı akım değişimleri grafiğe geçirilmiş, böylelikle ölçüm için gerekli kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Kesikli sistemde kullanılan elektrotlar; cam karbon çalışma elektrotu, pilatin karşıt elektrot ve Ag/AgCl (3 M) referans elektrottur. Kesikli sistem deneyleri için AMEL veya CHI 800B marka potansiyostatlar kullanılmıştır.

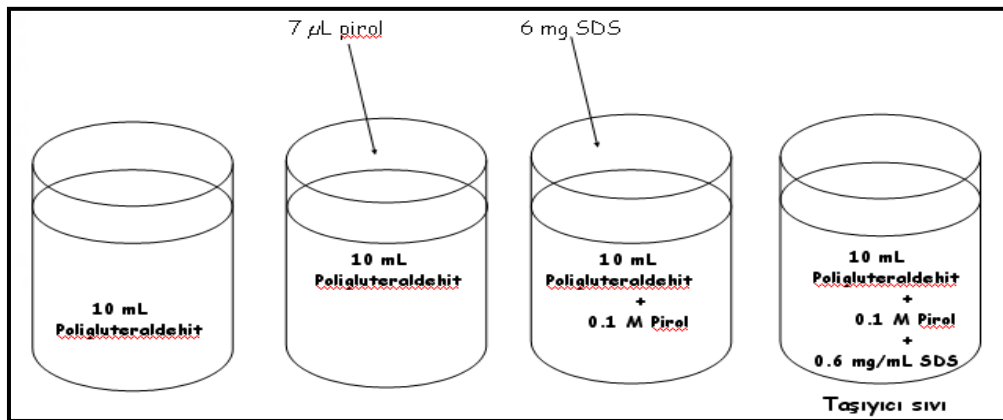


Şekil 4.2 Sürekli sistem deney düzeneği

4.3 Çalışma Elektrotlarının Hazırlanması

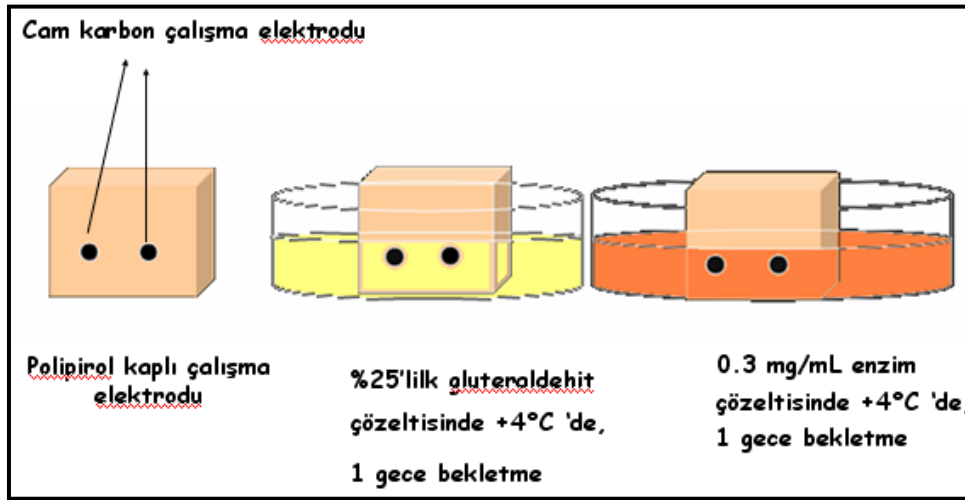
4.3.1 Sürekli Sistem için Polipirol / Poliglutaraldehit / Tyrosinaz /CNT/ Cam karbon (PPy/PGA/Tyr/CNT/GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

Çalışma kapsamında yapılan tüm çalışma elektrotları polipirol tabanlıdır. Polipirol, iletken olması bakımından elektrot ile reaksiyon ortamı arasında elektron akışını sağlar ve aynı zamanda enzim immobilizasyonu için destek matriks görevini görür. Pirolün polimerizasyon işlemi Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Pirolün polimerizasyonu için hazırlanan reaksiyon ortamı

Taşıyıcı sıvı, üçlü elektrot sisteminin bağlı olduğu akış hücresinden 1mL/dak debide HPLC pompası vasıtasıyla sirküle edilerek geçirilmiştir. Polimerizasyon reaksiyonu 0 - 1.2 Voltluk potansiyel aralığında, dönüşümlü voltametri (CV) tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiş ve polimerizasyon işlemi 5 dakikada tamamlanmıştır. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra çalışma elektrodu çıkarılarak sırasıyla gluteraldehit ve enzim çözeltisine bırakılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Polipirol kaplanmış sürekli sistem cam karbon elektrot yüzeyinde enzim immobilizasyonu

Karbon nanotüp (CNT), suda çözünmeyen bir yapıya sahiptir. CNT içeren elektropolimerizasyon ortamlarında CNT mutlaka suda çözünebilir halde olmalıdır. CNT'nin suda çözünebilmesi için literatürde farklı oksidasyon basamakları kullanılmaktadır. CNT, Zhao ve arkadaşları (2002) tarafından geliştirilmiş asit oksidatif metodu ile modifiye edilerek suda çözünebilir bir yapıya dönüştürülmüştür. Bu metoda göre; 14 mg MWCNT-COOH, hacimsel olarak 9:1 oranında hazırlanmış H_2SO_4/H_2O_2 karışımının 5 mL'sine eklenmiş ve 30 dakika karıştırılmıştır. Reaksiyondan sonra çözelti aynı H_2SO_4/H_2O_2 karışımı ile 20 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti ultrasonik banyoda (Elma 460-H) 5 dakika sonike edildikten sonra, saf su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 0.45 μM por çaplı selüloz membrandan süzölmüştür. Membranda tutulan MWCNT-COOH, pH değeri 7 olana kadar 10 mM'lık NaOH çözeltisiyle yıkanmış ve son olarak saf sudan geçirilmiştir. MWCNT-COOH tartılmış ve son konsantrasyonu 0.03 mg / L olacak şekilde saf suda çözülmüştür. Çözelti 2 dakika sonike edilmiştir.

10 mg tyrosinaz, 15 mL (pH 6.5) sitrat tamponunun içerisinde çözülmüştür. Daha sonra enzim çözeltisine okside edilmiş MWCNT-COOH çözeltisinden 15 mL, 18 mg SDS ve konsantrasyonu 0.01 M olacak şekilde pirol ilave edilmiştir. Homojen bir karışım sağlandıktan sonra çözelti sürekli sistemdeki cam karbon akış hücresinden 1 mL/dak debide sirküle edilerek geçirilmiştir. Elektrokimyasal polimerizasyon işlemi için akış hücresine 0-1,2 V'luk potansiyel uygulanmıştır. Elektrokimyasal polimerizasyon işlemi 10 dakikada tamamlanmıştır.

4.3.2 Sürekli Sistem için Polipirol / Poligluteralehit / Tyrosinaz / Cam karbon (PPy/PGA/Tyr/GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

Poligluteralehitli polipirol sentezi için 10 ml safsu içerisine; 2 mL (%25'lik) gluteralehit, 2 mL 0,1 M NaOH eklenerek 30 dk boyunca 600 rpm'de karıştırılmıştır. Çözeltinin pH'sı 10-11 arasındadır. Hazırlanan poligluteralehit çözeltisine 0,01 M olacak şekilde pirol, 0,6 mg/mL SDS ilave edilerek, üçlü elektrot sisteminin bağlı olduğu akış hücresinden 1mL/dak debide HPLC pompası vasıtasıyla sirküle edilerek geçirilmiştir (Şekil 3.3). Polimerizasyon reaksiyonu 0 - 1.2 Voltluk potansiyel aralığında, dönüşümlü voltametri (CV) tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiş ve polimerizasyon işlemi 5 dakikada tamamlanmıştır. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra çalışma elektrodu çıkarılarak sırasıyla gluteralehit ve enzim çözeltisine bırakılmıştır.

Daha sonra; 10 mg tyrosinaz, 15 mL (pH 6.5) sitrat tamponunun içerisinde çözülmüştür. Homojen karışım, üçlü elektrot sisteminden, 1 mL/dak debide sirküle edilerek geçirilmiştir. Elektrokimyasal polimerizasyon işlemi için akış hücresine 0-1,2 V'luk potansiyel uygulanmıştır. Elektrokimyasal polimerizasyon işlemi 10 dakikada tamamlanmıştır.

4.3.3 Kesikli Sistemde Karbodiimid Bağlama Metodu İle Elektrodların Hazırlanması

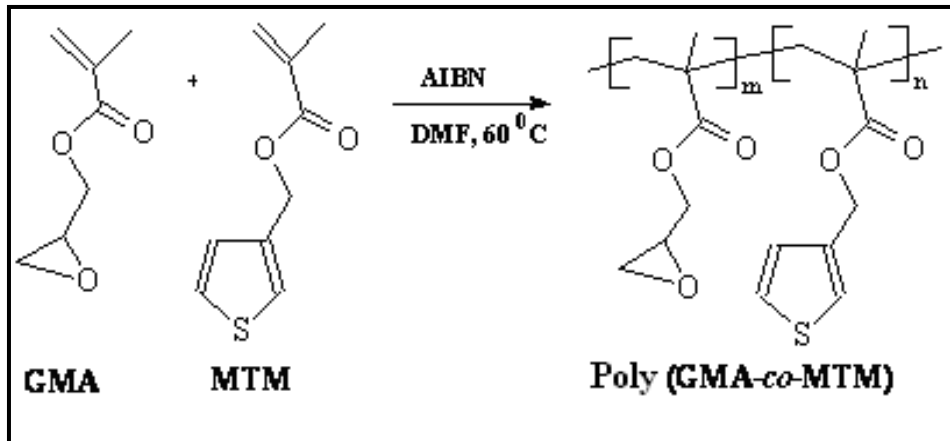
4.3.3.1 Polipirol / Karbon nanotüp /Karbodiimid/ Tyrosinaz / Cam karbon (PPy / CNT /karbodiimid/ Tyr / GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

Karbon nanotüp, Bölüm 4.3.1'de verilen oksidasyon prosedürüne tabi tutulmuştur. Polimerizasyon ortamı, 10 mL CNT çözeltisine, 0.6 mg/mL sodyum dodesil sülfat (SDS) ve konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde pirol eklenmiştir. Homojen bir karışım sağlandıktan sonra çözelti 10 mL'lik cam hücreye alınmış ve üçlü elektrot bağlantıları takılmıştır. Elektrokimyasal polimerizasyon işlemi için 0-1.2 V arasında potansiyel uygulanmıştır. Polimerizasyon reaksiyonu 4 dakikada tamamlanmıştır. Polimerizasyon işlemi bittikten sonra

cam karbon elektrot saf suyla yıkanmış, 0.1 M, pH 7 fosfat tamponuna (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) daldırılmış, 2V'luk potansiyel uygulanarak 5 dakika temizlemeye tabi tutulmuştur. 1 g 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimid metho-*p*-tolueno-sulphonate 50 mM pH 4.8 asetat tamponunun 20 mL'sinde çözünmüştür. Polipirol kaplı cam karbon elektrot bu çözeltiye daldırılmış, 200 rpm'lik karıştırma altında 3,5 saat karıştırılmıştır. 0.1 M, pH 7 fosfat tamponunun 2 mL'sinde 3 mg enzim çözülerek, enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Kaplanan elektrot bu çözelti içerisine daldırılmış ve 4°C'de 1 gece bekletilmiştir. 0.1 M, pH 7 fosfat tamponuna 30 dk hava verilmiştir.

4.3.3.2 Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate/ Polipirol/ Karbon nanotüp/ Karbodiimid/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/karbodiimid/Tyr/GC} Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

3- metiltienilmetakrilat (MTM) GYTE'e bağlı Kimya bölümünden sağlanmıştır. Buna göre, önceden belirlenmiş miktarlarda MTM (30%), glisin metakrilat (GMA) (70%), DMF ve AIBN Pyrex tüpüne yerleştirilmiştir. Karışımdan 10 dakika Argon gazı geçirilerek oksijeni alınmıştır. Tüpün ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra 60 ± 1 sıcaklıktaki termostatlı yağ banyosuna bırakılmıştır. Reaksiyondan sonra, oluşan kopolimer metanolde çöktürülmüş ve filtreden geçirilip 24 saatlik vakum altında kurutulmuştur (Alkan vd., 1999; Yılmaz vd., 2004; Yılmaz vd., 2005) Kopolimerin kimyasal yapısı Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5 Poli(GMA-co-MTM)'nin sentezi

Hazırlanmış olan Poly(GMA-co-MTM) çözeltisinden (0.6 mg/mL THF'de hazırlanmış) 20 μ L alınarak cam karbon elektrot yüzeyine damlatılmış ve solventi uçurulmuştur. Okside edilmiş CNT çözeltisinden 10 mL alınarak elektrokimyasal hücreye eklenmiştir. Bu karışım içerisinde konsantrasyonu 0.01 M olacak şekilde pirol ve 0.6 mg/mL SDS eklenip karıştırılmıştır. (-1.2)-(+1.2) V arasında polimerizasyon işlemi 4 dakika boyunca

gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi bittikten sonra cam karbon elektrot saf suyla yıkanmış, 0.1 M, pH 7 fosfat tamponuna (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) daldırılmış, 2V'luk potansiyel uygulanarak 5 dakika temizlemeye tabi tutulmuştur. Kaplanmış elektrot 5 mg/mL'lik 1-sikloheksil-3 (2-morfolinoetil) karbodiimid metho-*p*-toluen-sulfonat, (0.05 M, pH 4.8 asetat tamponunda hazırlanmış) çözeltisine daldırılmış ve 3,5 saat 200 rpm'lik karıştırma altında beklenmiştir. 0.1 M, pH 7 fosfat tamponunun 2 mL'sinde 3 mg enzim çözülerek, enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Kaplanan elektrot bu çözelti içerisinde daldırılmış ve 4°C'de 1 gece bekletilmiştir.

4.3.3.3 Polipirol / Karbodiimid/ Tyrosinaz / Cam karbon (PPy / karbodiimid/ Tyr / GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

10 mL, 0.1 M, pH 6.5 sitrat tamponuna 0.6 mg/mL sodyum dodesil sülfat (SDS) ve konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde pirol eklenmiştir. Homojen bir karışım sağlandıktan sonra çözelti 10 mL'lik cam hücreye alınmış ve üçlü elektrot bağlantıları takılmıştır. Elektrokimyasal polimerizasyon işlemi için 0-1,2 V arasında potansiyel uygulanmıştır. Polimerizasyon reaksiyonu 4 dakikada tamamlanmıştır. Polimerizasyon işlemi bittikten sonra cam karbon elektrot saf suyla yıkanmış, 0.1 M, pH 7 fosfat tamponuna (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) daldırılmış, 2V'luk potansiyel uygulanarak 5 dakika temizlemeye tabi tutulmuştur. 1 g 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimid metho-*p*-tolueno-sulphonate 50 mM pH 4.8 asetat tamponunun 20 mL'sinde çözünmüştür. Polipirol kaplı cam karbon elektrot bu çözeltiye daldırılmış, 200 rpm'lik karıştırma altında 3,5 saat karıştırılmıştır. 0.1 M, pH 7 fosfat tamponunun 2 mL'sinde 3 mg enzim çözülerek, enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Kaplanan elektrot bu çözelti içerisinde daldırılmış ve 4°C'de 1 gece bekletilmiştir. 0.1 M, pH 7 fosfat tamponuna 30 dk. hava verilmiştir.

4.3.3.4 Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate / Polipirol / Karbodiimid/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/karbodiimid/Tyr/GC} Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

Bölüm 4.3.2.2'deki şekilde hazırlanmış olan Poly(GMA-co-MTM) çözeltisinden (0.6 mg/mL THF'de hazırlanmış) 20 µL alınarak cam karbon elektrot yüzeyine damlatılmış ve solventi uçurulmuştur. 10 mL, 0.1 M, pH 6.5 sitrat tamponuna, 0.6 mg/mL sodyum dodesil sülfat (SDS) ve konsantrasyonu 0.01 M olacak şekilde pirol eklenmiştir. Homojen bir karışım sağlandıktan sonra çözelti 10 mL'lik cam hücreye alınmış ve üçlü elektrot bağlantıları takılmıştır. (-1.2)-(+1.2) V arasında polimerizasyon işlemi 4 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi bittikten sonra cam karbon elektrot saf suyla

yıkanmış, 0.1 M, pH 7 fosfat tamponuna (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) daldırılmış, 2V'luk potansiyel uygulanarak 5 dakika temizlemeye tabi tutulmuştur. Kaplanmış elektrot 5 mg/mL'lik 1-sikloheksil-3 (2-morfolinoetil) karbodiimid metho-*p*-toluen-sulfonat, (0.05 M, pH 4.8 asetat tamponunda hazırlanmış) çözeltisine daldırılmış ve 3,5 saat 200 rpm'lik karıştırma altında beklenmiştir. 0.1 M, pH 7 fosfat tamponunun 2 mL'sinde 3 mg enzim çözülerek, enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Kaplanan elektrot bu çözelti içerisinde daldırılmış ve 4°C'de 1 gece bekletilmiştir.

4.3.4 Elektropolimerizasyon ile Kesikli Sistem için Elektrotların Hazırlanışı

4.3.4.1 Polipirol / Karbon nanotüp/ Tyrosinaz/ Cam karbon (PPy / CNT / Tyr / GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

Bölüm 4.3.1'de verilen oksidasyon prosedürüne tabi tutulan karbon nanotüp (CNT) çözeltisi kullanılmıştır.. Polimerizasyon ortamı, 10 mL CNT çözeltisinde hazırlanmıştır. Bu çözeltiye 0.6 mg/mL sodyum dodesil sülfat (SDS) ve konsantrasyonu 0.01 M olacak şekilde pirol ve 1,5 mg/mL tyrosinaz enzimi çözeltisi (0.1 M, pH 7 fosfat tamponunun 2 mL'sinde 3 mg enzim çözülerek hazırlanan) eklenmiştir. Homojen bir karışım sağlandıktan sonra çözelti 10 mL'lik cam hücreye alınmış ve üçlü elektrot bağlantıları takılmıştır. Elektrokimyasal polimerizasyon işlemi için 0-1,2 V'luk potansiyel uygulanmıştır. Polimerizasyon reaksiyonu 4 dakikada tamamlanmıştır. Polimerizasyon işlemi bittikten sonra cam karbon elektrot saf suyla yıkanmış, 0.1 M, pH 7 fosfat tamponuna (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) daldırılmış, 2V'luk potansiyel uygulanarak 5 dakika temizlemeye tabi tutulmuştur.

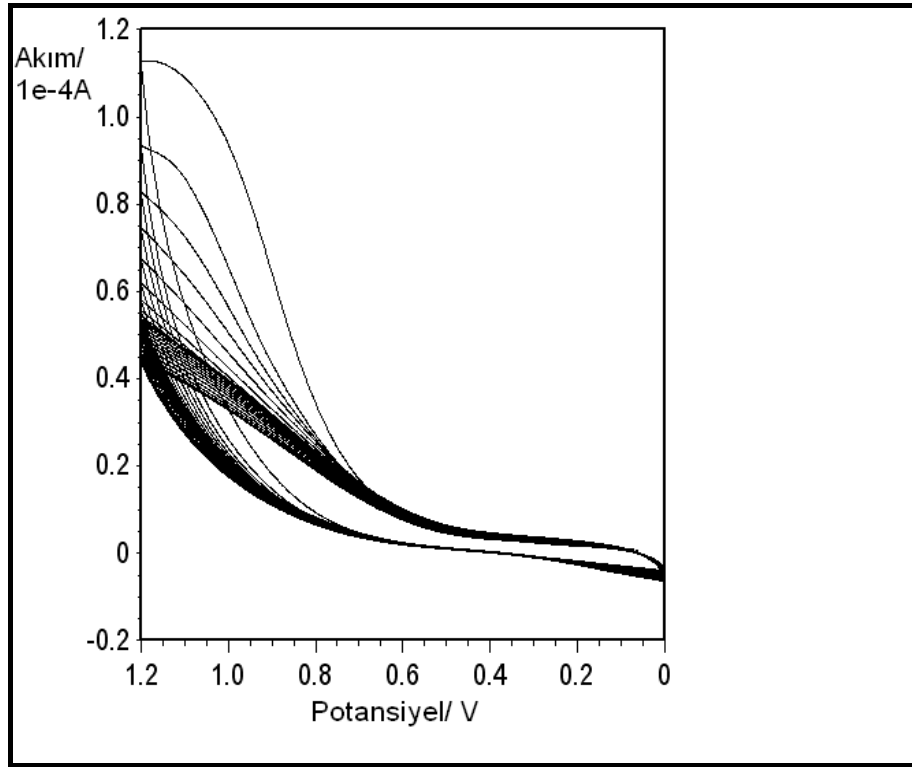
4.3.4.2 Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate/ Polipirol/ Karbon nanotüp/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC} Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

Bölüm 4.3.2.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan Poly(GMA-co-MTM) çözeltisinden (0.6 mg/mL THF'de hazırlanmış) 20 µL alınarak cam karbon elektrot yüzeyine damlatılmış ve solventi uçurulmuştur. Okside edilmiş CNT çözeltisinden (Bölüm 4.3.1'de anlatıldığı gibi) 10 mL alınmış ve elektrokimyasal hücreye eklenmiştir. Bu karışım içerisinde 7,1 µL (konsantrasyonu 0.01 M olacak şekilde) pirol ve 0.6 mg/mL SDS ve 1,5 mg/mL tyrosinaz enzimi çözeltisi (0.1 M, pH 7 fosfat tamponunun 2 mL'sinde 3 mg enzim çözülerek hazırlanan) eklenip karıştırılmıştır. (-1.2)–(+1.2) V arasında polimerizasyon işlemi 4 dakikaboyunca gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi bittikten sonra cam karbon elektrot saf suyla yıkanmış, 0.1 M, pH 7 fosfat tamponuna (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) daldırılmış, 2V'luk potansiyel uygulanarak 5 dakika temizlemeye tabi tutulmuştur.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

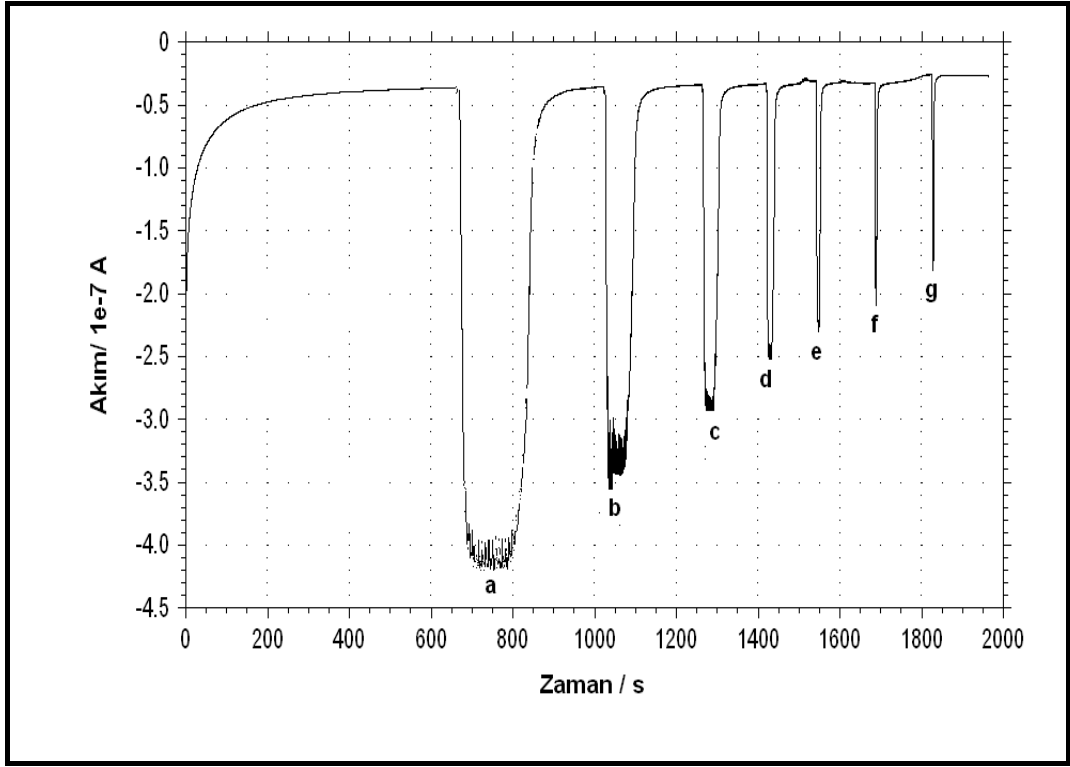
5.1 Polipirol / Karbon nanotüp / Tyrosinaz / Cam karbon (PPy / PGA./CNT / Tyr / GC) Sürekli Sistem Çalışma Elektrodu Bulguları

Bölüm 4.3.1’de hazırlanmış olan çalışma elektrodu sürekli sistemde çalışılmıştır. Elektropolimerizasyona ait dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 5.1’de gösterilmiştir.



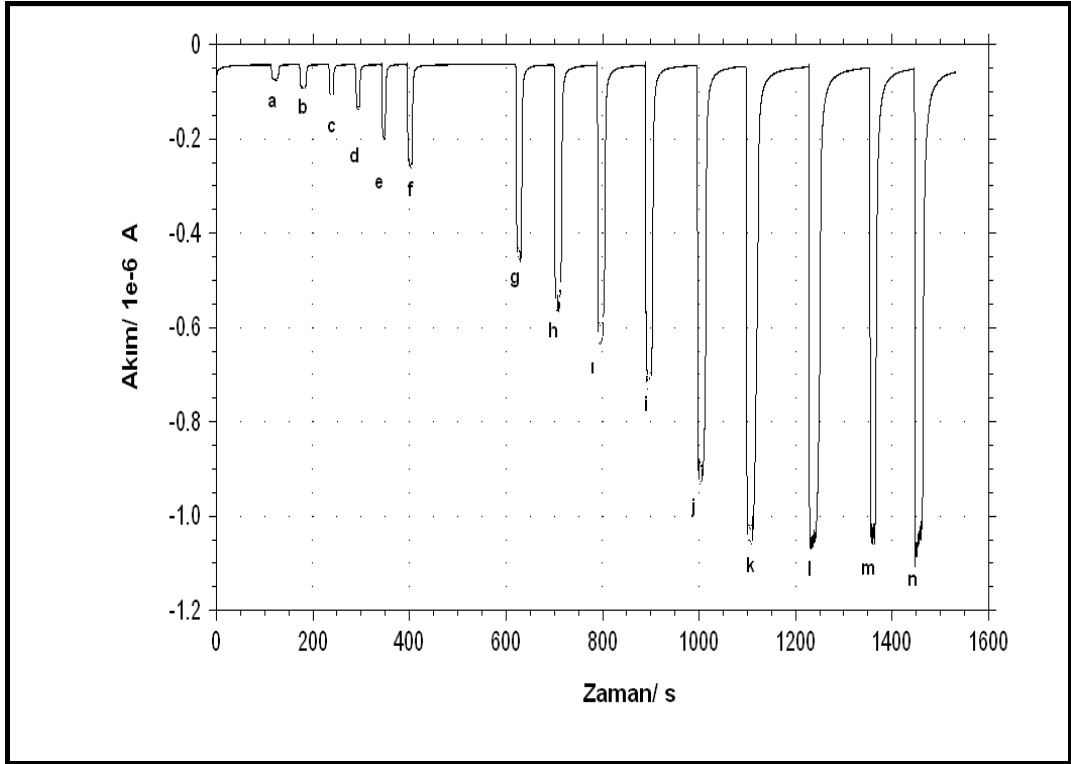
Şekil 5.1 PPy / CNT / Tyr / GC çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği (tarama hızı 100 mVs-1)

Sırasıyla 0,1-0,25-0,5-1-2-4-6 mL/dk akış hızlarında taşıyıcı sıvıya 45 μ M’lık katekol enjeksiyonları yapılmış ve bu enjeksiyonlar sonucu elde edilen akım değişimleri -50 mV’luk bir çalışma potansiyelinde kaydedilmiştir. Farklı debilere ait pik oluşumları Şekil 5.2’de gösterilmiştir. Akış hızı arttıkça katekolün enzim ile temas süresi azalmış, buna bağlı olarak enzimatik reaksiyon süresi de kısıtlanmıştır. Bu nedenle akış hızı arttıkça oluşan piklerin boy ve büyüklükleri de azalma eğilimi göstermiştir. Sürekli sistem için hazırlanan elektrotlarda akış hızı 1 mL/dk olarak seçilmiştir. Sürekli sistemin hazırlanan elektrotların kıyaslaması Bölüm 5.2’de verilmiştir.



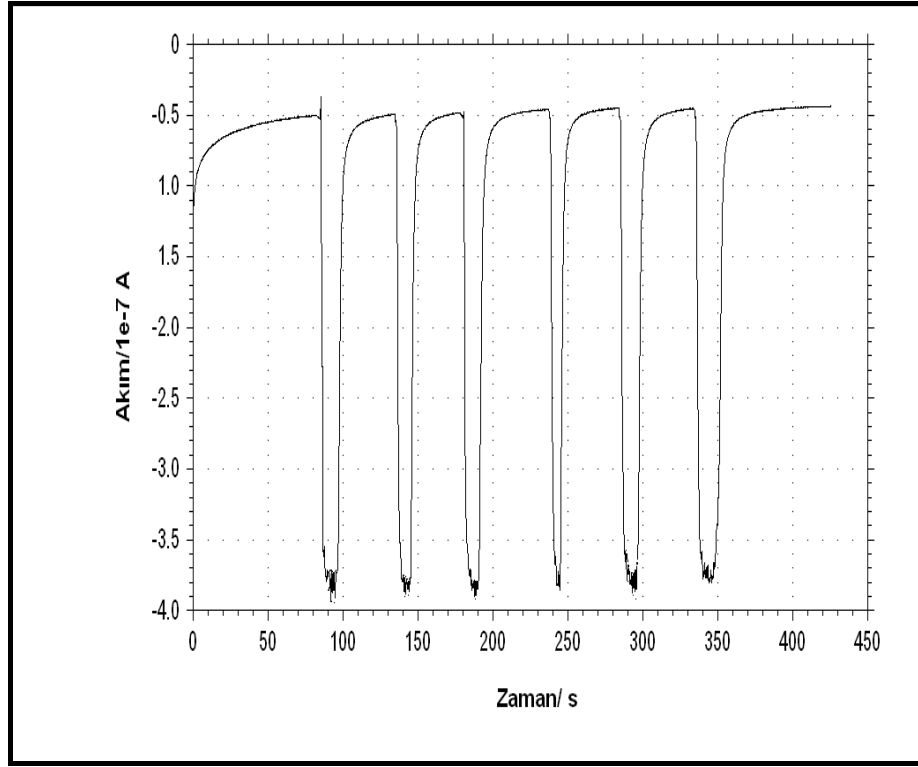
Şekil 5.2 0,1 mL/dak (a), 0,25 mL/dak (b), 0,5 mL/dak (c), 1 mL/dak (d), 2 mL/dak (e), 4 mL/dak (f), 6 mL/dak (g) akış hızlarında katekol enjeksiyonlarından elde edilen pik oluşumları

Biyosensörde belirlenebilir maksimum ve minimum katekol konsantrasyonlarının tespiti için sürekli sisteme 1 mL/dak akış hızında, sırasıyla 0,003 - 0,005 - 0,0075 - 0,01 - 0,02 - 0,03 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 5 mM katekol enjeksiyonları yapılmıştır. Yapılan enjeksiyonlar sonucu oluşan akım değişimleri Şekil 5.3’de gösterilmiştir. Şekilden de anlaşıldığı gibi katekol konsantrasyonu arttırıldığı zaman elde edilen pik akımları da artmıştır. Katekol için minimum belirlenebilir konsantrasyon 0.003 mM, maksimum konsantrasyon ise 1 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.3 0.003mM (a), 0.005mM (b), 0.0075mM (c), 0.01mM (d), 0.02mM (e), 0.03mM (f), 0.05mM (g), 0.1mM (h), 0.2mM (i), 0.3mM (j), 0.5mM (k), 1mM (l), 2mM (m), 3mM (n), 5mM (o) katekol enjeksiyonları sonucu elde edilen pik oluşumları

Biyosensörde artarda yapılan ölçümlerin doğruluğunun kontrolü için sürekli sisteme 1mL/dak dakış hızında 45 μ M'lık katekol enjeksiyonları yapılmıştır (Şekil 5.4). Ardarda yapılan 6 enjeksiyon sonucu elde edilen pik akımlarının standart sapma değeri $\pm 4,99.10^{-9}$ A olarak hesaplanmıştır.

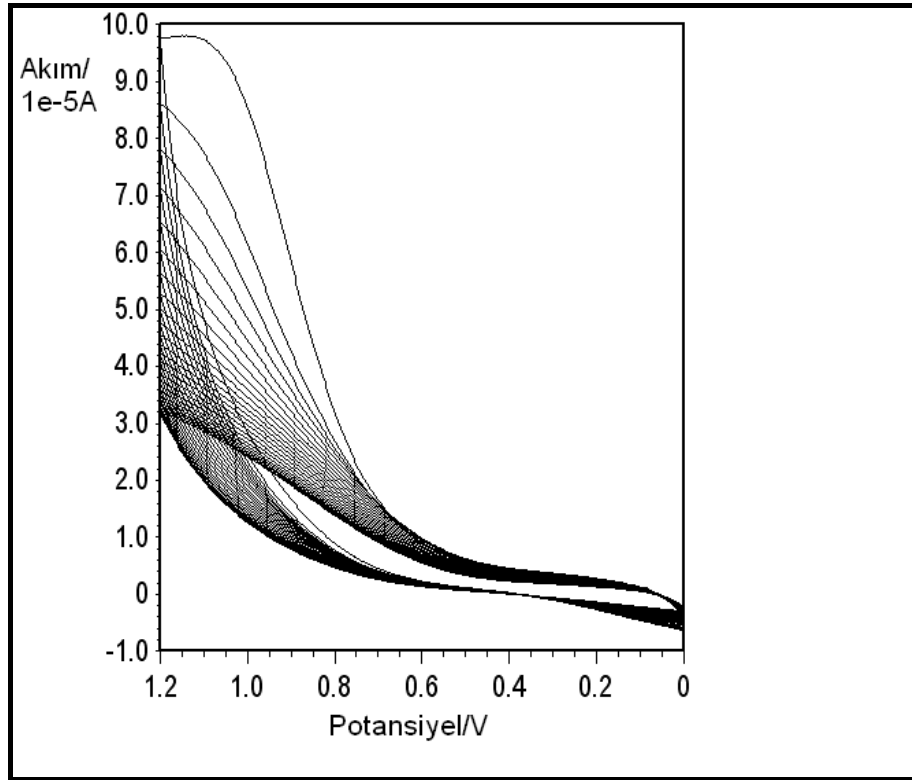


Şekil 5.4 PPy / CNT / Tyr / GC çalışma elektroduna ait tekrarlanan 45 μM 'lık katekol ölçümleri (tarama hızı 100 mVs^{-1} ; pH:7,0)

Hazırlanan çalışma elektrodunun aktivite kaybını görebilmek için, 40. günün sonunda 45 μM 'lık katekol çözeltisi, 1 mL/dak debide sistemden tekrar geçirilmiştir. Hazırlanan çalışma elektrotu 7.hafta sonunda başlangıç aktivitesinin % 40'ını kaybetmiştir. Bu değer son yıllarda yapılan çalışmalarla kıyaslandığında daha iyi olduğu görülmüştür (El Kaoutit vd., 2007; Abu-Rabeah vd., 2005; Tembe vd., 2007). Hazırlanan çalışma elektrodu kullanılmadığı zamanlarda, buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 0.1 M, pH 7 fosfat tamponu içerisinde saklanmıştır.

5.2 Polipirol / Tyrosinaz / Cam karbon (PPy/PGA/Tyr/GC) Sürekli Sistem Çalışma Elektrotu Bulguları

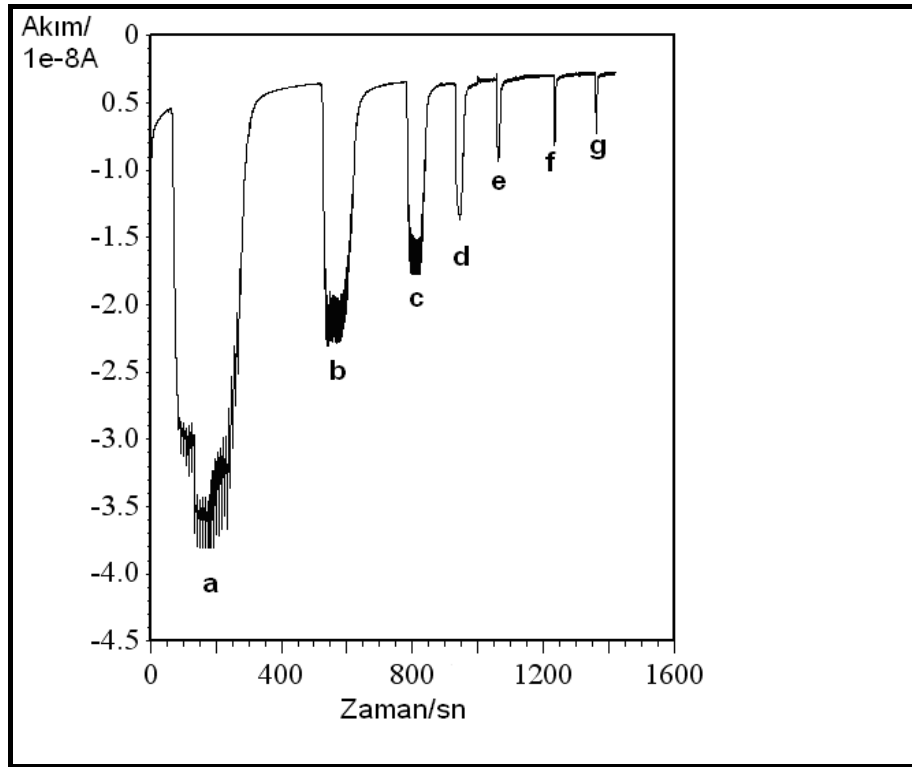
Bölüm 4.3.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan çalışma elektrotu sürekli sistemde çalışılmıştır. Elektropolimerizasyona ait voltametri grafiği Şekil.5.5’de verilmiştir. CNT modifiye edilmiş çalışma elektrotunun (PPy/CNT/Tyr/GC) akım değerlerinin, Ppy/Tyr/GC çalışma elektrotunun akım değerlerine göre oldukça yüksek olduğu açık bir şekilde görülmektedir (Şekil 5.1, Şekil 5.5). Bu durum, CNT’ün elektrot ve enzim arasında elektron transfer edebilme özelliğine sahip olmasından dolayı elektrotta daha iletken bir film meydana gelmesiyle açıklanabilir. Elektropolimerizasyona ait dönüşümlü voltametri grafiklerinde, iletken polimer ile tyrosinaz enzimi arasındaki elektron transferinde herhangi bir engelleme olmadığından pik potansiyelleri ve pik yapıları bakımından bir fark görülmemektedir.



Şekil.5.5 PPy/Tyr/GC çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği (tarama hızı 100 mVs-1)

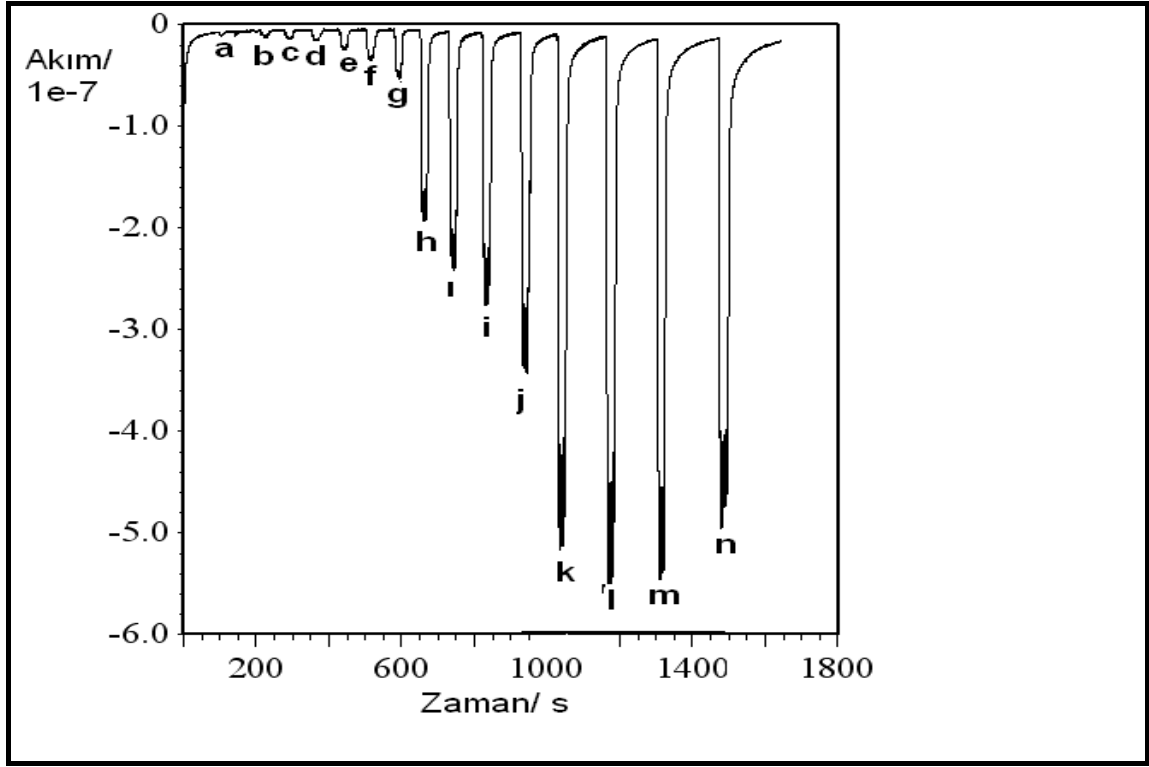
Sırasıyla 0,1-0,25-0,5-1-2-4-6 mL/dak akış hızlarında taşıyıcı sıvıya 45 μ M katekol enjeksiyonu yapılmış ve bunun sonucu elde edilen akım değişimleri -50 mV'luk bir çalışma potansiyelinde kaydedilmiştir. Farklı debilere ait pik oluşumları Şekil 5.6'da gösterilmiştir. Akış hızı arttıkça katekolün enzim ile temas süresi azaldığından enzimatik reaksiyon süresi de

kısıtlanmıştır. Bu nedenle akış hızı arttıkça oluşan piklerin boy ve büyüklükleri de azalma eğilimi göstermiştir. CNT ile hazırlanan elektrotun akım değerleri, CNT'siz elektrota göre daha büyüktür. Düşük akış hızlarında (0,1-0,25-0,5 ml/dk), düşük örnek üretimi, örnek dispersiyonunda azalma ve uzun tutma zamanının bir sonucu olarak daha yüksek bir cevap süresi görülmüştür. 1 ml/dk' dan daha yüksek akış hızlarında daha kısa bir cevap süresi elde edilmiştir. Yüksek akış hızlarında akım kararlılığında bozulma görülmüş ve daha düşük belirleme limitleri sağlanmıştır. Bu yüzden sürekli sistem için hazırlanan elektrotlarda 1 mL/dk akış hızında çalışılmıştır.



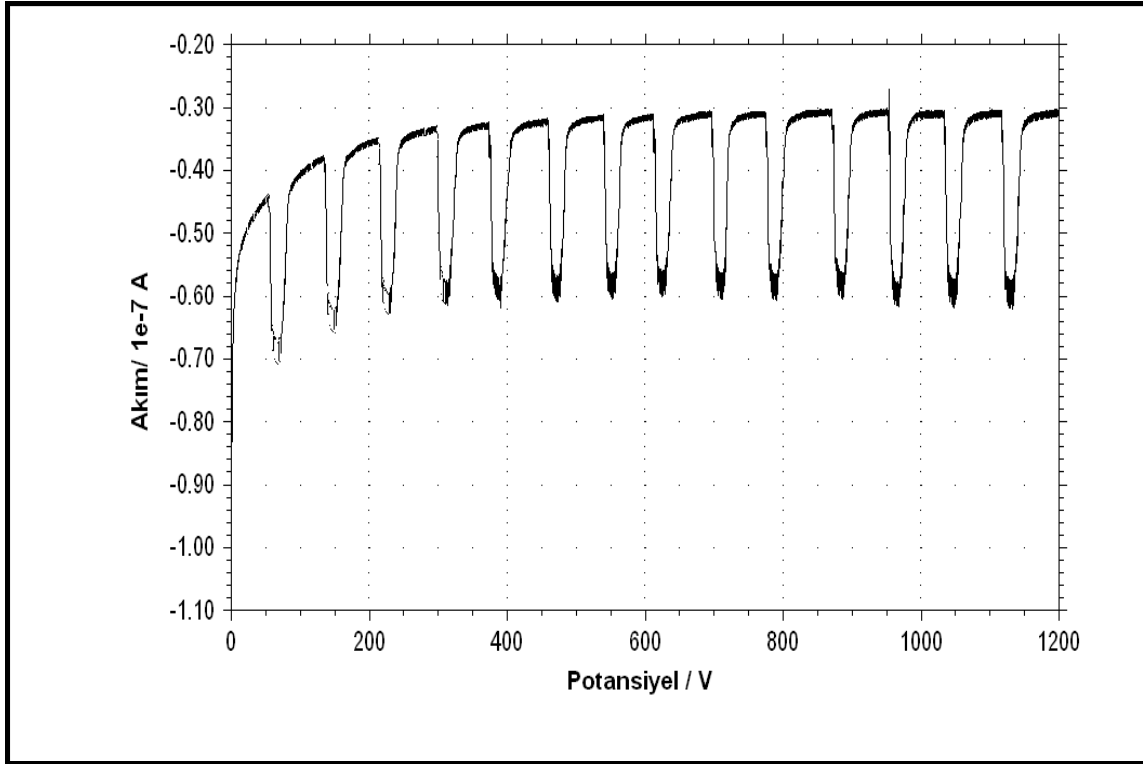
Şekil 5.6 0,1 mL/dak (a), 0,25 mL/dak (b), 0,5 mL/dak (c), 1 mL/dak (d), 2 mL/dak (e), 4 mL/dak (f), 6 mL/dak (g) akış hızlarında katekol enjeksiyonlarından elde edilen pik oluşumları katekol için farklı debilerde pikler (tarama hızı 100 mVs⁻¹, pH:7,0)

Biyosensörde belirlenebilir maksimum ve minimum katekol konsantrasyonlarının tespiti için sürekli sisteme 1 mL/dak akış hızında, sırasıyla 0,003 - 0,005 - 0,0075 - 0,01 - 0,02 - 0,03 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 5 mM katekol enjeksiyonları yapılmıştır. Her enjeksiyon sonucu oluşan akım değişimleri Şekil 5.7'de gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi katekol konsantrasyonu arttırıldığı zaman elde edilen pik akımları da artmıştır. Katekol için minimum belirlenebilir konsantrasyon 0.003 mM, maksimum konsantrasyon ise 1 mM olarak belirlenmiştir.



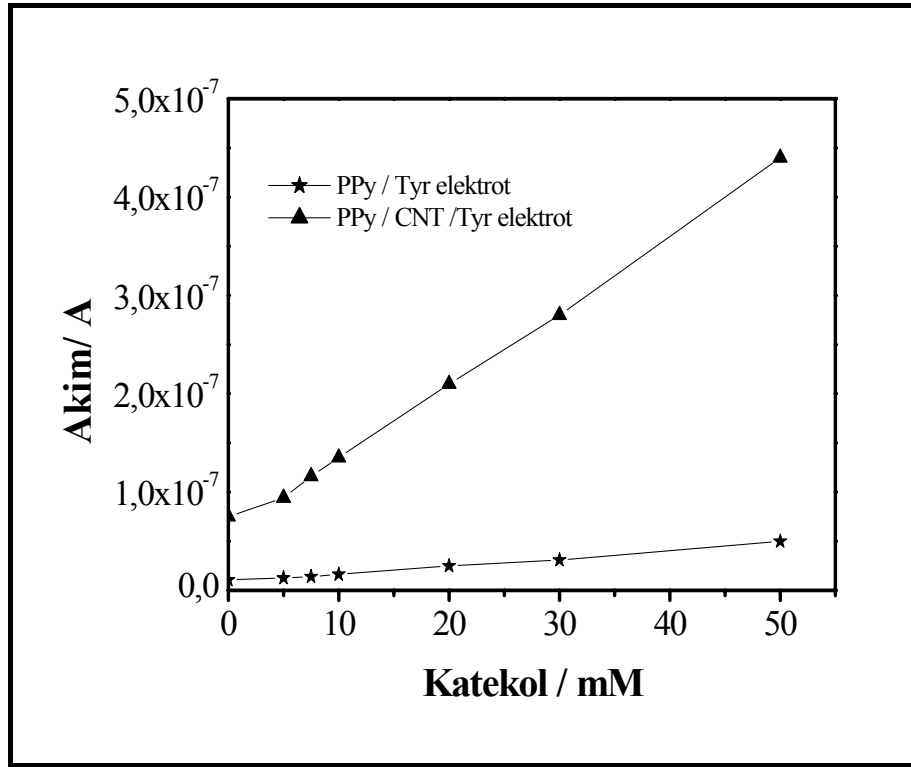
Şekil 5.7 0.003mM (a), 0.005mM (b), 0.0075mM (c), 0.01mM (d), 0.02mM (e), 0.03mM (f), 0.05mM (g), 0.1mM (h), 0.2mM (i), 0.3mM (j), 0.5mM (k), 1mM (l), 2mM (m), 3mM (n), 5mM (o) katekol enjeksiyonları sonucu elde edilen pik oluşumları

Çalışma elektrotunda artarda yapılan ölçümlerin doğruluğunun kontrolü için sürekli sisteme 1mL/dak akış hızında 45 μ M'lık katekol enjeksiyonları yapılmıştır (Şekil 5.8). Artarda yapılan 14 enjeksiyon sonucu elde edilen pik akımlarının standart sapma değeri, $\pm 1,743 \cdot 10^{-9}$ A olarak hesaplanmıştır. Çalışma elektrodunun 60 gün sonunda başlangıç aktivitesini koruduğu, ancak 10. hafta sonunda yapılan ölçümlerde başlangıç aktivitesinin %85'ini kaybettiği görülmüştür. Hazırlanan çalışma elektrodu kullanılmadığı zamanlarda, buzdolabında +4°C'de 0,1 M, pH 7 fosfat tamponu içerisinde saklanmıştır. Relatif standart sapma değerleri PPy/CNT/Tyr ve Ppy/Tyr elektrotları için sırasıyla %0,54 ve %1,55 olarak bulunmuştur.



Şekil 5.8 PPy/Tyr/GC çalışma elektroduna ait tekrarlanan 45 μM 'lık katekol ölçümleri (tarama hızı 100 mVs^{-1} ; pH:7,0;)

Şekil 5.3 ve Şekil 5.7'den elde edilen artan katekol konsantrasyonlarıyla elde edilen pik yükseklikleri kullanılarak her iki çalışma elektrotu için analitik kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Bu eğriler Şekil 5.9'da karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinden faydalanılarak, sürekli sistem için hazırlanan her iki elektrotu ait analitik hesaplamalar yapılmış olup sonuçlar Tablo 5.1'de verilmiştir. Tablodaki belirleme limiti (LOD) değeri, $3s_b/m$ kriterine göre hesaplanmıştır (Hasebe ve Osteryoung, 1975). Burada; m , kalibrasyon eğrinin lineer aralık eğimi, s_b ise aynı konsantrasyonlarda katekol enjeksiyonlarının sonuçlarından elde edilen standart sapma değerini göstermektedir. Tablodan da görülebileceği gibi her iki elektrotun da lineer aralığı $3\text{-}50 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Bu değerin katekol için, son zamanlarda yapılan çalışmalarda hazırlanan çeşitli çalışma elektrotlarından daha geniş bir değer olduğu görülmektedir (Sanz vd., 2005; Wang vd., 1994; Kim ve Lee, 2003; Serra vd., 2001; Zhao ve Zhi, 2006; Wang vd., 2000; Vianello vd., 2006; Li vd., 2006; Chang vd., 2002). Hazırlanan PPy/CNT/Tyr ve Ppy/Tyr elektrotları için belirleme limiti (LOD) değerleri, sırasıyla $0,671 \mu\text{M}$ ve $1,440 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Literatürde yapılan çeşitli çalışmalarda, katekol için bu değer $0,7\text{-}6 \mu\text{M}$ olarak verilmiştir (Dantoni vd., 1998; El Kaoutit vd., 2007; Abu-Rabeah vd., 2005; Tembe vd., 2007)



Şekil 5.9 PPy/MWCNT/Tyr/GC ve Ppy/Tyr/GC elektrotları için kalibrasyon eğrileri

Fenol biyosensörünün hassasiyeti enzim reaksiyonunda üretilen fenoksi radikallerinin kararlılığına, elektrot materyaline, enzim tutuklama metoduna, uygulanan potansiyelin büyüklüğüne bağlıdır (Liu vd., 2006). Katekol için, PPy/CNT/Tyr elektrotunun hassasiyeti $8 \text{ nA} / \mu\text{M}$ olup, Ppy/Tyr elektrotundan ($0,9 \text{ nA} / \mu\text{M}$) daha yüksek bir değere sahiptir. Bu durum sadece tyrosinazın aktivitesine bağlı olmayıp aynı zamanda tutuklanmış veya üretilmiş matrkxin yapısyylada ilgilidir. İncelenen literatür çalışmalarında, katekol için hassasiyet değerleri $0,08\text{-}6,1 \text{ nA} / \mu\text{M}$ olarak verilmiştir (Rijiravanich vd., 2006, Liu vd., 2006; Yıldız vd., 2007 ve Cristea vd.,2005).

Çizelge 5.1 PPy/CNT/Tyr/GC ve Ppy/Tyr/GC elektrotlarının analitik özellikleri

<i>Elektrot</i>	<i>R²</i>	<i>Hassasiyet (nA/μM)</i>	<i>Lineer aralık(μM)</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>Cevap süresi (s)</i>	<i>%RSD</i>
PPy/CNT/Ty	0,998	8	3-50	0,671	10	0,54
r						
PPy/Tyr	0,994	0,9	3-50	1,440	30	1,55

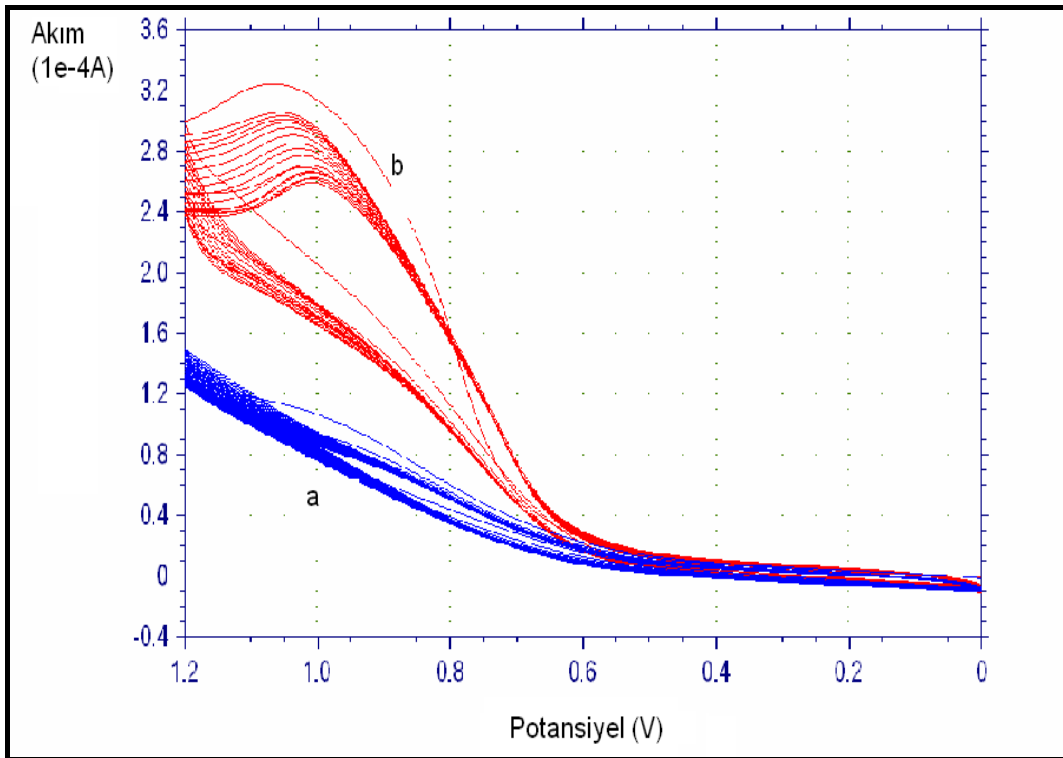
Substrat eklemesi sonucunda, sistemin dengeye gelme süresi “cevap süresi”olarak tanımlanabilir (Besombes vd., 1995). 1 ml/dk debide hazırlanan elektrotlar için elde edilen

cevap süreleri Tablo 5.1’de verilmiştir.

5.3 Karbodiimid Bağlama Metodu ile Hazırlanan Kesikli Çalışma Elektrotu Bulguları

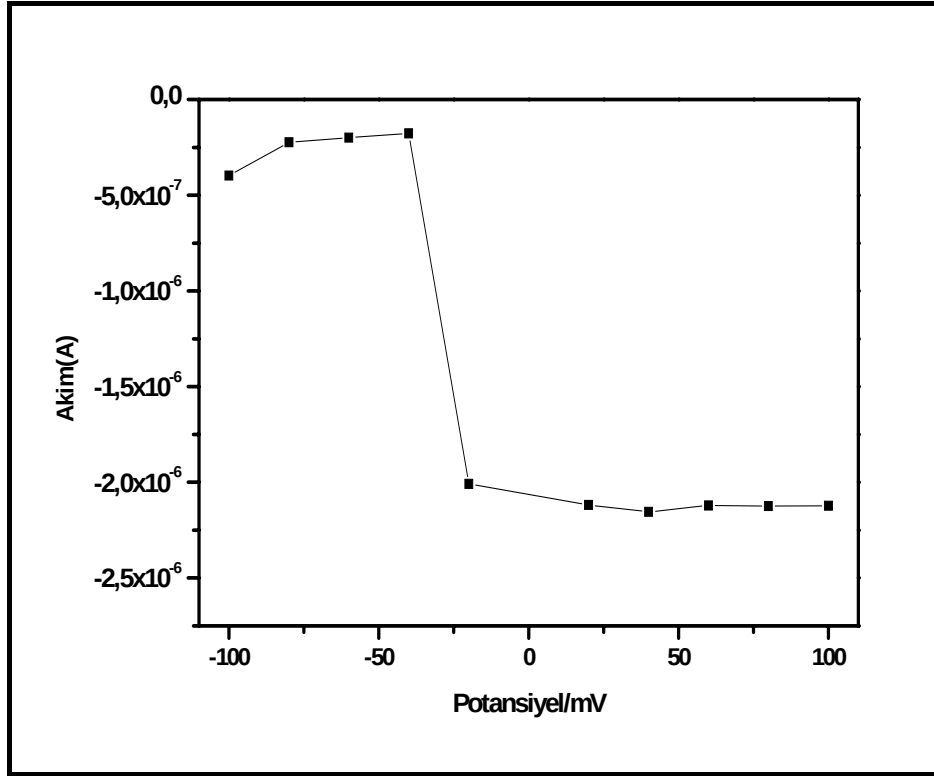
5.3.1 Polipirol / Karbon nanotüp /Karbodiimid/ Tyrosinaz / Cam karbon (PPy / CNT /karbodiimid/ Tyr / GC) Kesikli Çalışma Elektrot Bulguları

Bölüm 4.3.3.1’de hazırlanmış çalışma elektrodu kesikli sistemde 18 farklı fenol türünün tespiti için kullanılmıştır. Bölüm 4.3.2.1’de sözü geçen elektropolimerizasyon için dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 5.10’da gösterilmiştir.



Şekil 5.10 PPy/Tyr/GC (a), PPy/CNT/Tyr/GC (b) çalışma elektrotlarına ait dönüşümlü voltametri grafiği 0.1 M fosfat tamponu(pH 7.0); 0- +1.2 V ;tarama hızı, 50mVs⁻¹.)

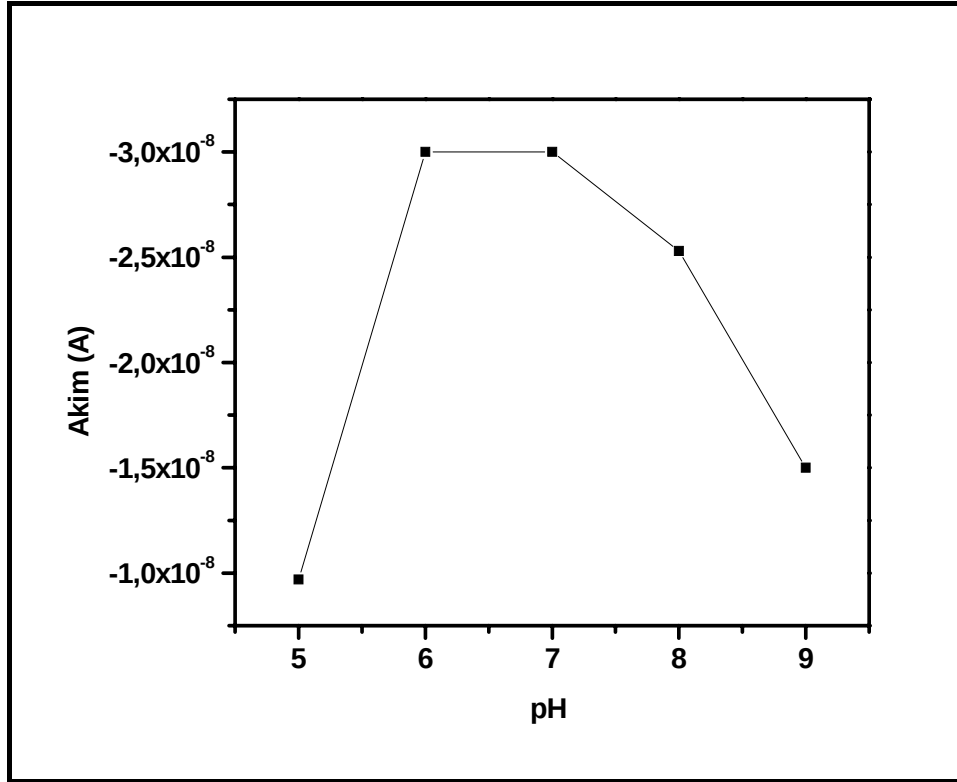
Şekil 5.10’da görüldüğü gibi PPy/CNT/Tyr/GC elektrotunun kaplama esnasındaki akım değerleri, PPy/Tyr/GC elektrotunkine göre oldukça yüksek bulunmuştur. Bu durum elektrot hazırlanmasında CNT’nin ortama ilavesiyle ilişkilidir. Enzimatik reaksiyonun elektrokimyasal olarak izlenmesi reaksiyon sonucu oluşan fenoksi radikallerinin elektrot üzerinde indirgenmesiyle sağlanır. Söz konusu indirgenme akımı ortamdaki oksijenin yeterli olması durumunda reaksiyon ortamına eklenen fenoliğin konsantrasyonuyla orantılı gelişir (Tsain vd., 2007).



Şekil 5.11 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi (pH:7,0)

Farklı çalışma potansiyellerinde PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun 10 μ L, 200mM'lık pyrokatekol eklemelerine olan tepkisi Şekil 5.11'de gösterilmiştir. İndirgenme akımı 0 mV'dan itibaren -50 mV'a kadar hızlı bir şekilde artmış ve daha negatif potansiyellerde indirgenme akımındaki bu artışın yavaşladığı görülmüştür. Bu nedenle çalışma potansiyeli -50 mV seçilmiştir. Pyrokatekol dışındaki diğer fenolik türler için de aynı deneyler yapılmış ve benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

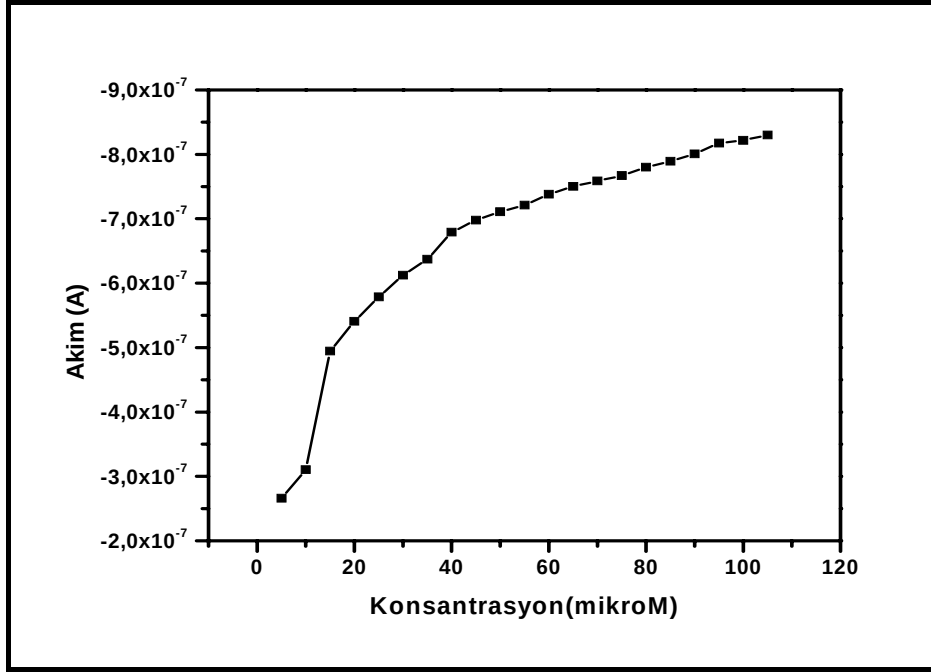
Optimum pH değerini elde edebilmek için, 200 mM pyrokatekol çözeltisi farklı pH'lardaki reaksiyon ortamına, 5 μ M konsantrasyonunda eklenmiştir. pH etkisi Şekil 5.12'de gösterilmiştir. Denemeler sonunda optimum pH=7 olarak bulunmuştur. Diğer fenol bileşikleri için de pH=7,0 reaksiyon ortamı kullanılmıştır.



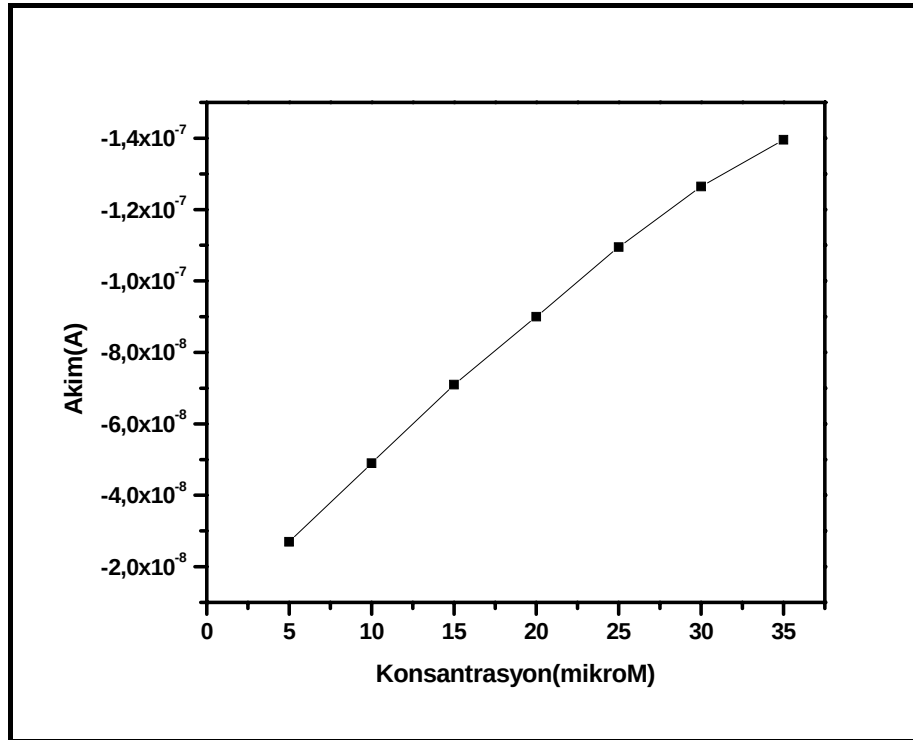
Şekil.5.12 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodu için optimum pH'nın belirlenmesi

Optimize edilmiş deney koşullarında çalışma elektrotunun 18 fenol bileşiğine (fenol, katekol, *p*-benzokinon, *m*-kresol, *o*-kresol, *p*-kresol, guaiakol, 2,4-dimetilfenol, 2,6-dimetoksifenol, 2-klorofenol, 3-klorofenol, 4-klorofenol, hidrokinon, 4-asetamidofenol, pyrogallol, 4-metoksifenol, pyrokatekol, 2-aminofenol) verdiği tepki incelenmiştir. Kesikli ortamda, 600 rpm'lik karıştırma altında, -50 mV'luk (vs. Ag/AgCl) çalışma potansiyelinde her bir fenol bileşiği için, 200 mM'lık stok çözeltilerinden, 5 µM konsantrasyondan başlamak üzere düzenli olarak artan konsantrasyonlarda reaksiyon ortamına eklemeler yapılmış ve akım değişimleri gözlenmiştir.

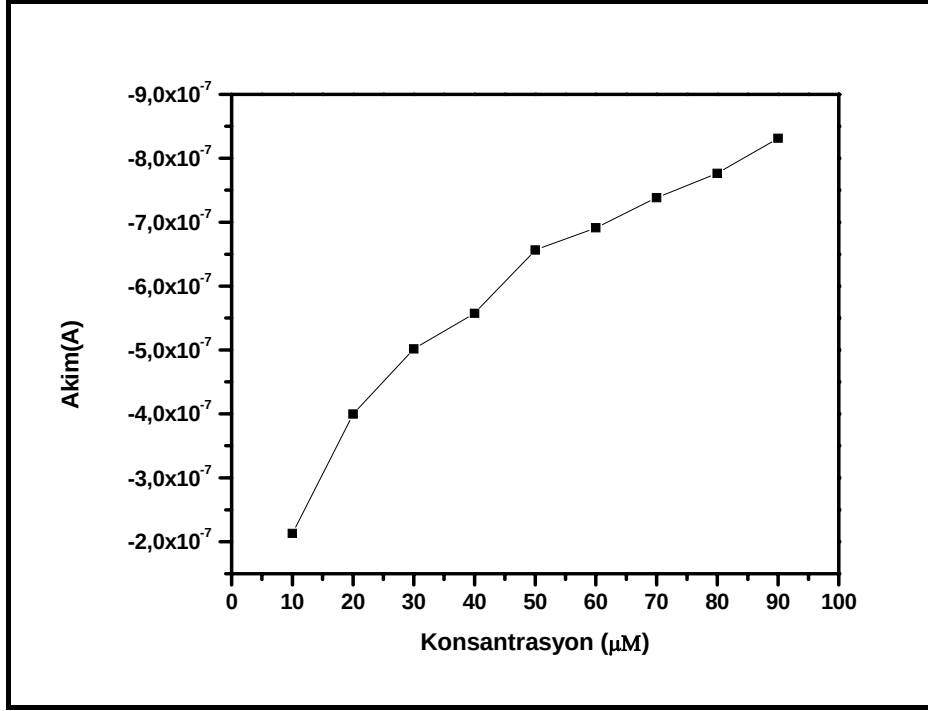
Hazırlanan çalışma elektrotuna tepki veren her bir fenolik konsantrasyonuna karşı elde edilen akım değişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Elde edilen veriler Şekil 5.13, Şekil 5.14, Şekil 5.15, Şekil 5.16 ve Şekil 5.17(a,b)'de verilmiştir.



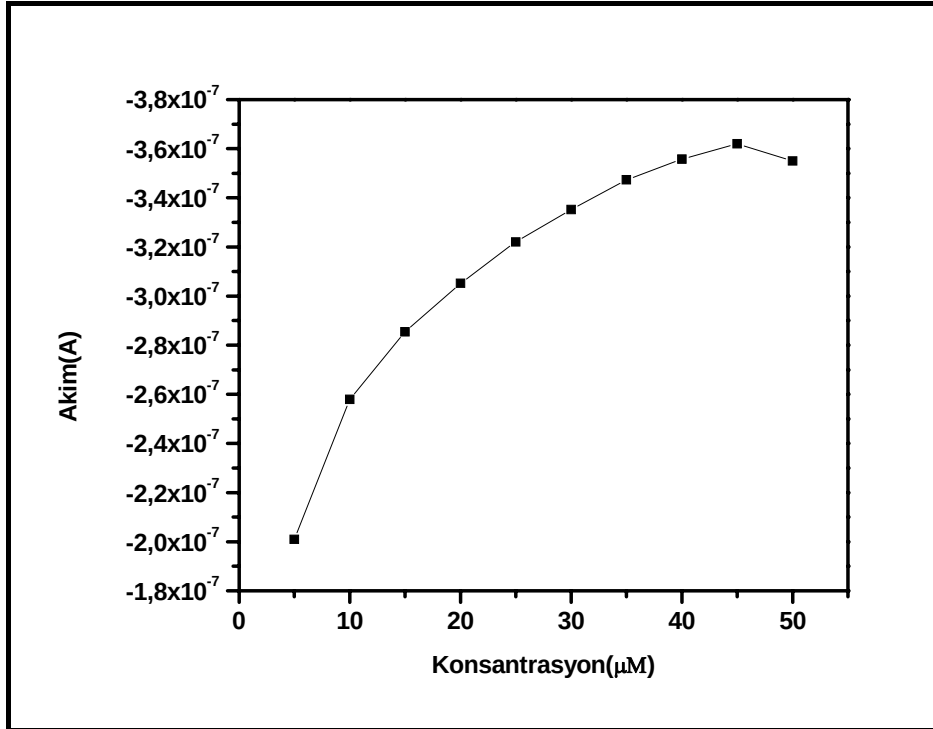
Şekil 5.13 4-Asetamidfenol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50mV)



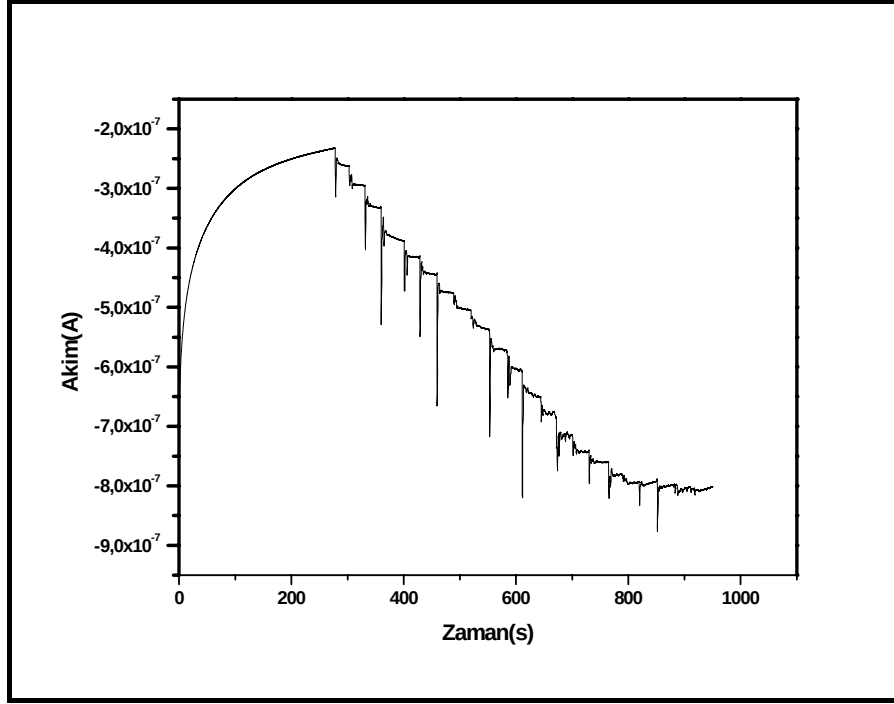
Şekil 5.14 4metoksifenol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50mV)



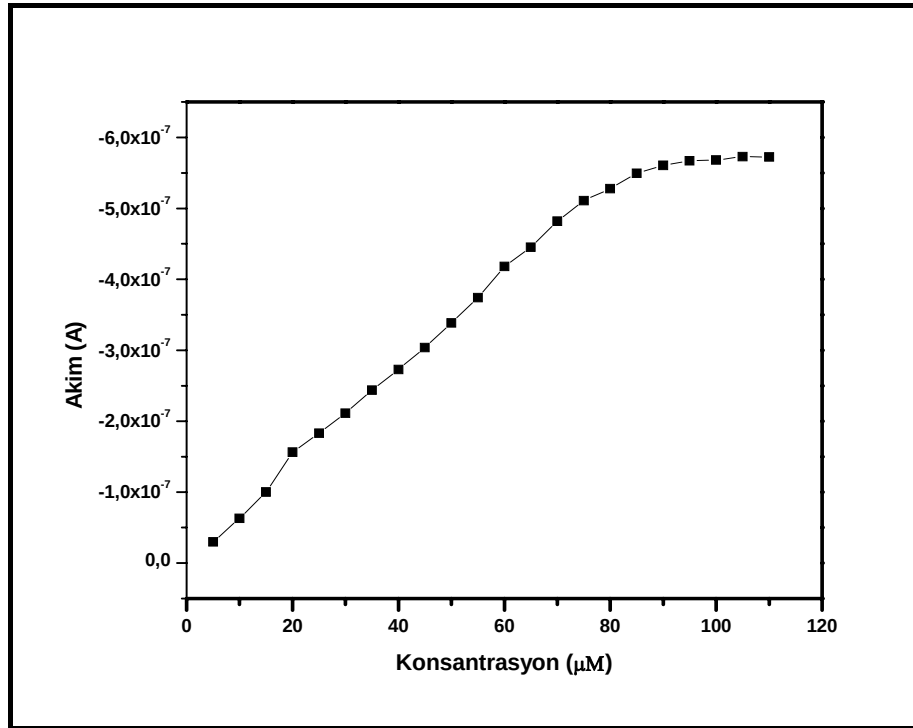
Şekil 5.15 Katekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50mV)



Şekil 5.16 p-kresol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50mV)

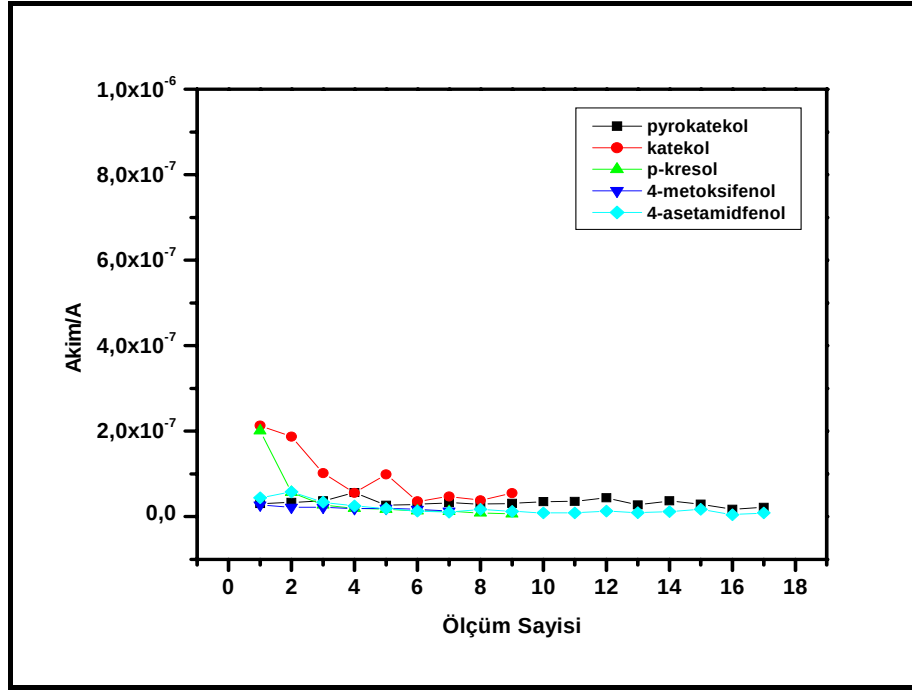


(a)



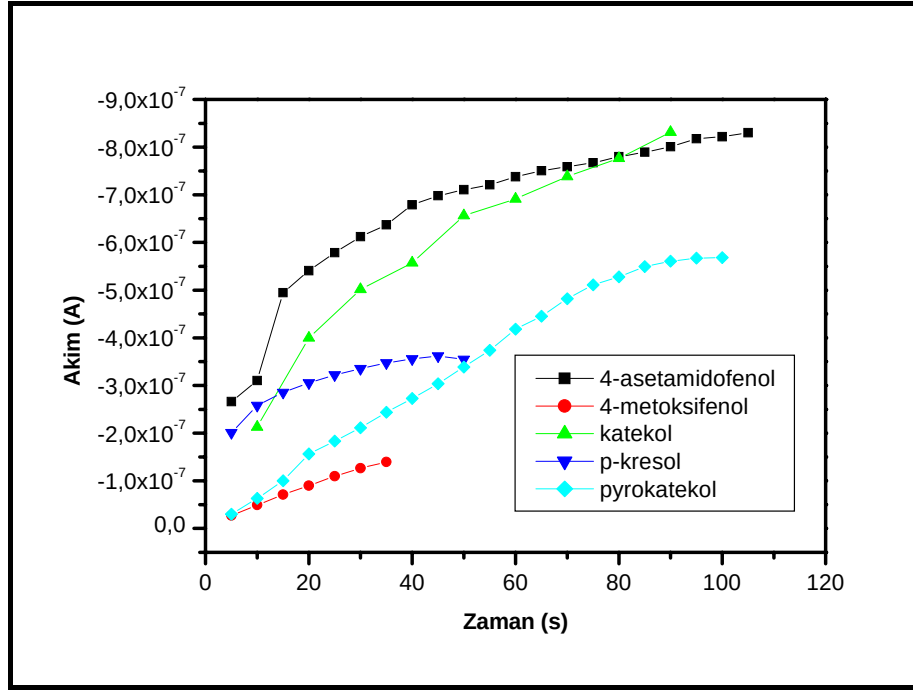
(b)

Şekil 5.17 pyrokatekol için (a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50mV)



Şekil 5.18 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için stabilitesi (pH=7,0; V=-50mV)

Bu kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmış analitik parametreler Tablo 5.2’de verilmiştir. Hazırlanan çalışma elektrotunun pyrokatekol, katekol, p-kresol, 4-metoksifenol ve 4-asetamidfenol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Biyosensör uygun hassasiyet değeri, düşük belirlleme limiti, geniş lineer aralık, hızlı cevap süresi ve güvenilir aralıkta ölçüm stabilitesi göstermiştir (Şekil 5.18). CNT’nin elektron transferini hızlandırıcı etkisi olduğu ve daha fazla miktarda enzim immobilizasyonuna olanak sağladığı sonucuna varılmıştır (Korkut vd., 2008; Tsai ve Chiu, 2007). Farklı fenol bileşikleri için hazırlanan kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırmaları Şekil 5.19’da verilmiştir.



Şekil 5.19 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması (pH=7,0; V=-50mV)

Hazırlanan çalışma elektrotu için, 4-asetamidofenol bileşiği oldukça düşük bir belirleme limitine sahiptir. Belirleme limitleri bakımından 4-asetamidofenol<pyrokatekol<4-metoksifenol<p-kresol<katekol şeklinde bir sıralama mevcuttur. Relatif standart sapma değerleri ise %0,914-%11,2 aralığında değişmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda hazırlanmış olan çeşitli fenol biyosensörlerinde belirleme limiti yukarıdaki fenol bileşikleri için 0.34-5 μM aralığında verilmiştir (Kim ve Lee, 2003; Verdine vd., 2003; Turner,2000; Wang vd., 2000). Yapılan düzenli ölçümlerde 40 gün sonunda biyosensörün aktivitesini %55 oranında kaybettiği gözlenmiştir. Hazırlanan çalışma elektrodu kullanılmadığı zamanlarda, buzdolabında +4°C’de 0.1 M, pH 7 fosfat tamponu içerisinde saklanmıştır.

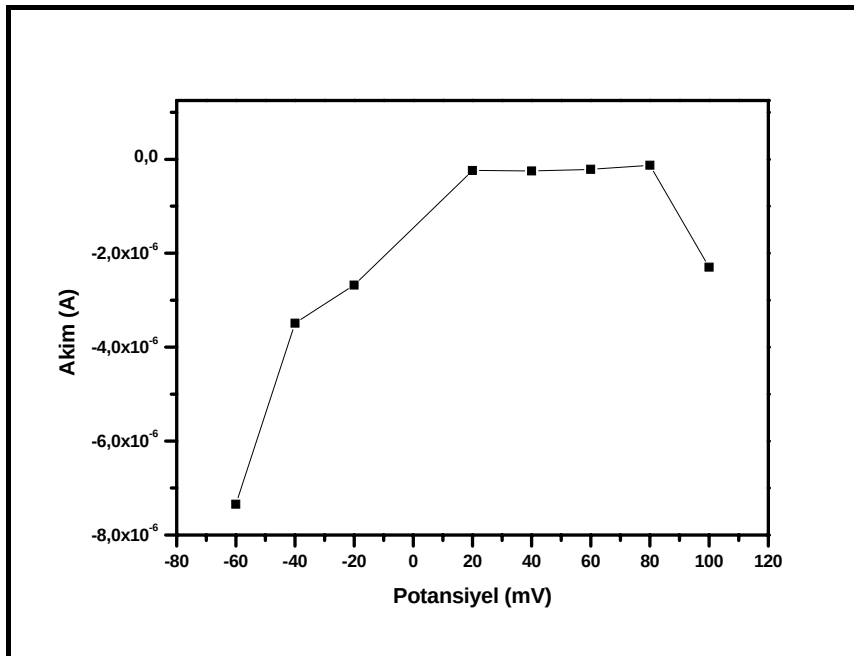
Çizelge 5.2 PPy/CNT/karbodiimid/Tyr/GC çalışma elektrotu için analitik parametreler

<i>Fenolik Tür</i>	<i>R²</i>	<i>Hassasiyet (nA/μM)</i>	<i>Lineer aralık (μM)</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>Std. Sapma (nA)</i>	<i>%RSD</i>
Fenol	<i>Tepki yok</i>					
p-benzokinon	<i>Tepki yok</i>					
hidrokinon	<i>Tepki yok</i>					
2,6 dimetoksifenol	<i>Tepki yok</i>					
2-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
3-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
2-aminofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-aminofenol	<i>Tepki yok</i>					
pyrokatekol	0,99	7	5-85	0,4177	±2,581	2,711
guaiakol	<i>Tepki yok</i>					
m-kresol	<i>Tepki yok</i>					
o-kresol	<i>Tepki yok</i>					
p-kresol	0,98	3	15-40	2,05	±2,05	11,2
katekol	0,98	6	20-90	0,177	±0,354	0,64
4-asetamidofenol	0,97	2	35-105	0,1732	±0,1155	0,914
pyrogallol	<i>Tepki yok</i>					
4-metoksifenol	0,99	4	5-35	1,08	±21,2	6,82

5.3.2 Polipirol /Karbodiimid/Tyrosinaz (PPy/Tyr/GC) Çalışma Elektrodu Bulguları

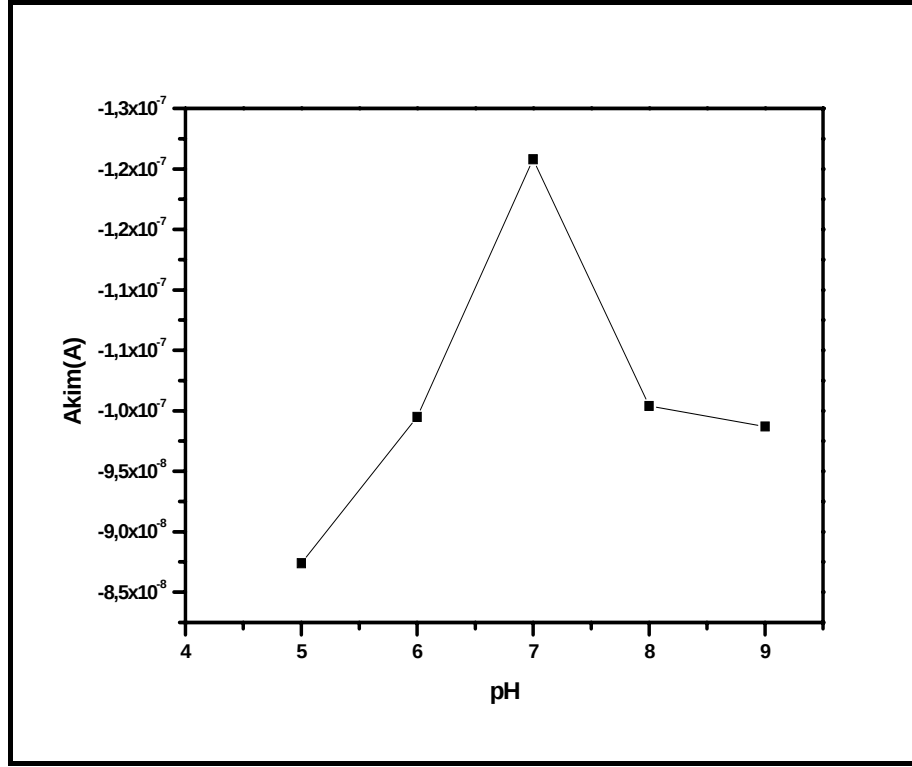
Bölüm 4.3.3.3'deki şekilde hazırlanan çalışma elektrotu kesikli sistemde 18 farklı fenol bileşiğinin tespiti için kullanılmıştır. Ppy/Tyr/GC ve Ppy/Tyr/CNT/GC elektrotlarının elektropolimerizasyonuna ait voltametri grafiği Şekil 5.10'da verilmiştir. Bu grafikte görülebileceği gibi, CNT modifiye edilmiş çalışma elektrotunun (PPy/CNT/Tyr/GC)akım değerleri, Ppy/Tyr/GC çalışma elektrotunun akım değerlerine göre oldukça yüksek bulunmuştur. Bu durum, CNT'ün elektrot ve enzim arasında elektron transfer edebilme özelliğine sahip olmasından dolayı elektrotta daha iletken bir film meydana gelmesiyle açıklanabilir (Zhao vd.,2002, Tsai ve Chiu, 2007).

Farklı çalışma potansiyellerinde PPy/Tyr/GC çalışma elektrodunun 10 μ L ,200mM'lık pyrokatekol eklemelerine olan tepkisi Şekil 5.20'da gösterilmiştir. -60mV ile 100 mV arasında uygulanan potansiyellerde; -50 mV'dan sonra elde edilen akım değerlerinde düşüş görülmüştür. Özellikle pozitif potansiyel değerlerinde elde edilen akımlar oldukça düşüktür. Bu nedenle çalışma potansiyeli -50 mV seçilmiştir. Pyrokatekol dışındaki diğer fenolik türler için de aynı deneyler yapılmış ve benzer sonuçlara ulaşılmıştır.



Şekil 5.20 PPy/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi(pH:7.0)

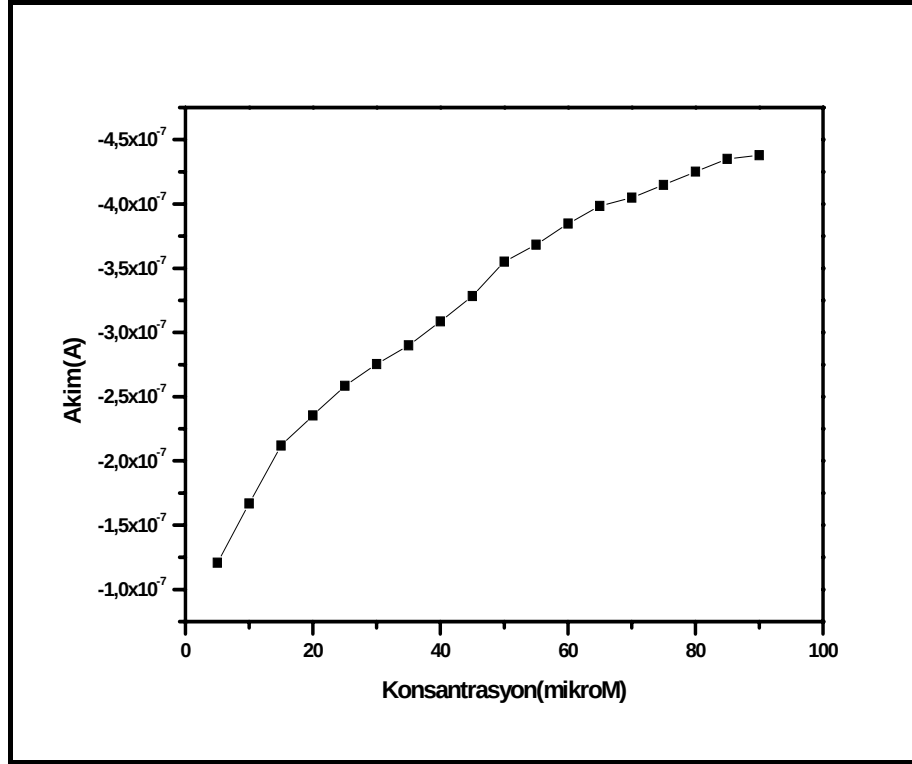
Optimum pH değerini elde edebilmek için, 200 mM pyrokatekol çözeltisi farklı pH'lardaki reaksiyon ortamına, 5 μ M konsantrasyonunda eklenmiştir. pH etkisi Şekil 5.21'de gösterilmiştir. Denemeler sonunda optimum pH=7,0 olarak bulunmuştur. Diğer fenol bileşikleri için de pH=7,0 reaksiyon ortamı kullanılmıştır.



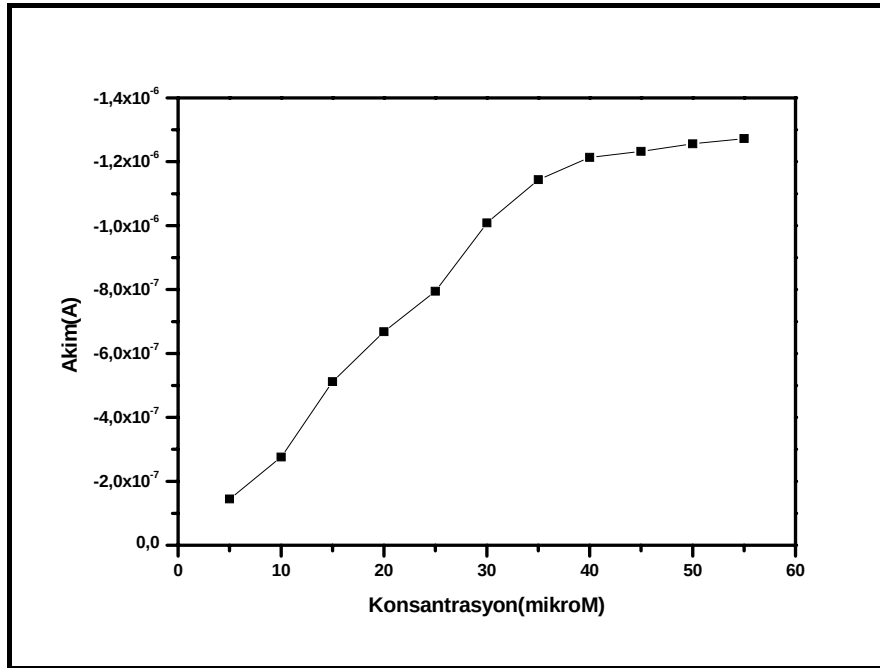
Şekil 5.21 PPy/Tyr/GC çalışma elektrodu için optimum pH'nın belirlenmesi (V=-50 mV)

Optimize edilmiş deney koşullarında çalışma elektrodunun 18 fenol bileşiğine (fenol, katekol, *p*-benzokinin, *m*-kresol, *o*-kresol, *p*-kresol, guaiakol, 2,4-dimetilfenol, 2,6-dimetoksifenol, 2-klorofenol, 3-klorofenol, 4-klorofenol, hidrokinon, 4-asetamidofenol, pyrogallol, 4-metoksifenol, pyrokatekol, 2-aminofenol) verdiği tepki incelenmiştir. Kesikli ortamda, 600 rpm'lik karıştırma altında, -50 mV'luk (vs. Ag/AgCl) çalışma potansiyelinde her bir fenol bileşiği için, 200 mM'lık stok çözeltilerinden, 5 μ M konsantrasyondan başlamak üzere düzenli olarak artan konsantrasyonlarda reaksiyon ortamına eklemeler yapılmış ve akım değişimleri gözlenmiştir.

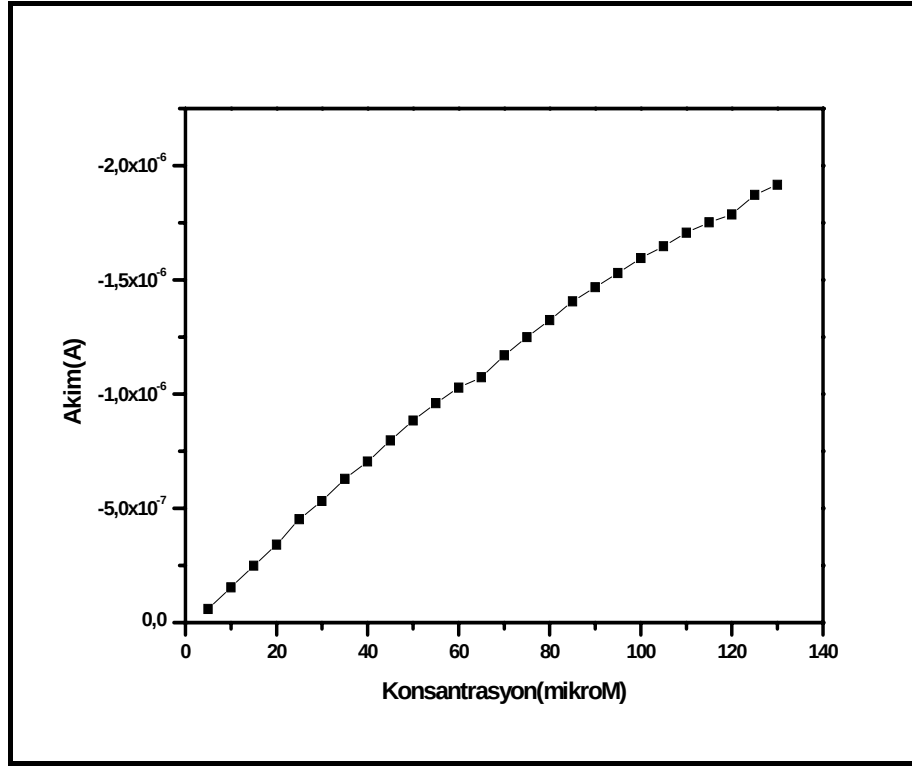
Hazırlanan çalışma elektrotuna tepki veren her bir fenolik konsantrasyonuna karşı elde edilen akım değişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Akım değişimlerine ait grafik ve kalibrasyon eğrileri Şekil 5.22, Şekil 5.23, Şekil 5.24, Şekil 5.25 ve Şekil 5.26 (a,b)'de verilmiştir.



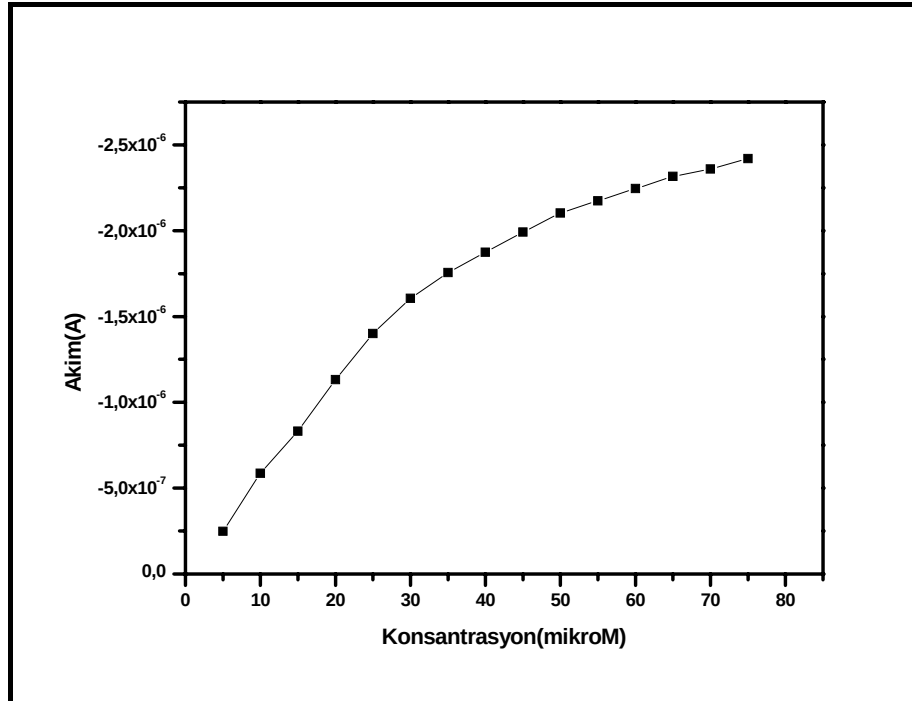
Şekil 5.22 pyrokatekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V= -50mV)



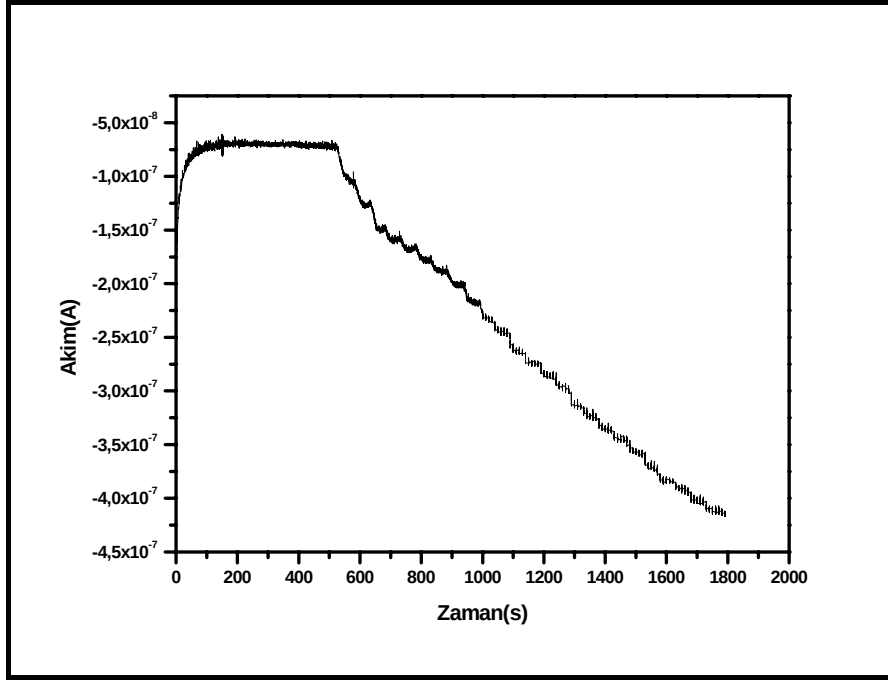
Şekil 5.23 pyrogallol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V= -50mV)



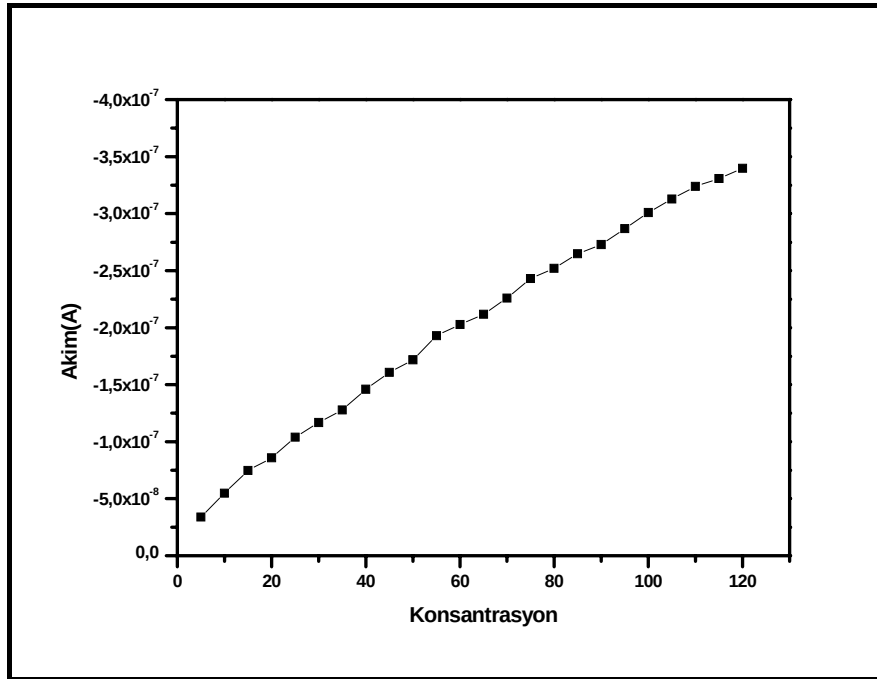
Şekil 5.24 p-benzokinon için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V= -50mV)



Şekil 5.25 Hidrokinon için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V= -50mV)

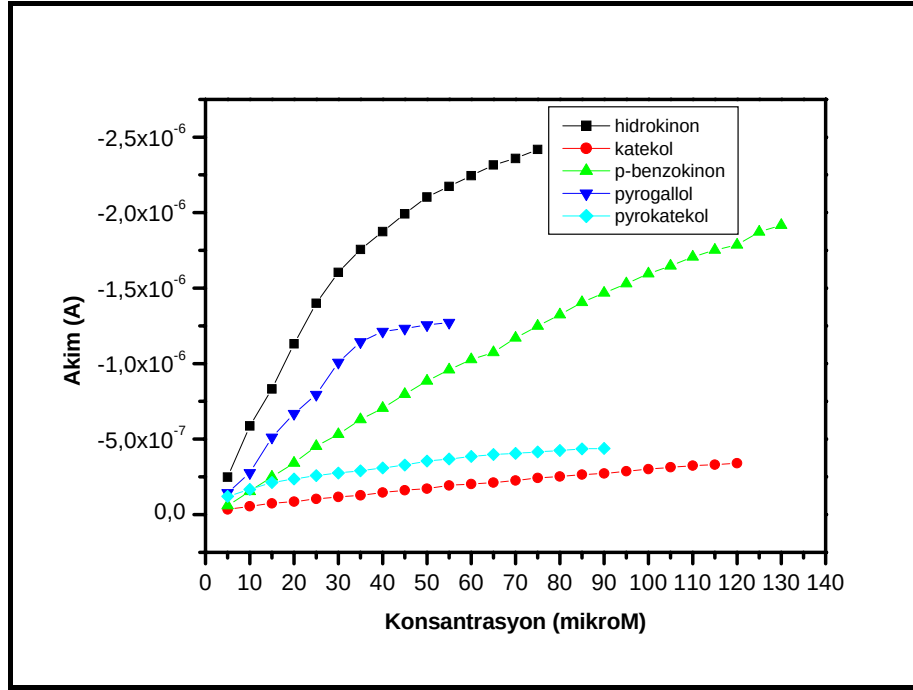


(a)



(b)

Şekil 5.26 Katekol için (a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V= -50mV)



Şekil 5.27 PPy/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması (pH=7,0; V=-50mV)

Hazırlanmış olan kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanan analitik parametreler Çizelge 5.3'de verilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin birbirleriyle kıyaslanması Şekil 5.27'de gösterilmiştir. Çalışma elektrotunun p-benzokinon, hidrokinon, pyrokatekol, katekol ve pyrogallol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Tablodan da anlaşılacağı gibi pyrogallol bileşiği diğer fenol bileşiklerine göre daha yüksek bir hassasiyet değerine sahiptir. Biyosensörün tepki verdiği fenol bileşikleri için hassasiyet sıralaması pyrogallol > p-benzokinon > pyrokatekol > hidrokinon = katekol şeklindedir. Fenol bileşikleri arasındaki hassasiyetin farklı olması, matriksin hidrofobik özelliklerinden dolayı, tutuklanan matrikste her bir fenol bileşiğinin çözünülebilirliğine ve moleküler engellemeye bağlı olduğu tespit edilmiştir (Rajesh ve Kaneto, 2005).

p-benzokinon, hidrokinon, pyrokatekol, katekol ve pyrogallol bileşikleri için belirleme limitleri sırasıyla 0,743; 0,2425; 1,132; 0,4472 ve 0,4115 μM olarak bulunmuştur. Belirleme limitleri bakımından en düşük değer görüldüğü gibi hidrokinon bileşiğine aittir. Bu değerlerin son yıllarda yapılan çalışmalarda hazırlanan çeşitli fenol biyosensörleriyle kıyaslandığında uygun aralıklarda olduğu görülmüştür. (El Kaoutit vd., 2007). Relatif standart sapma (RSD) değerleri ise %2,615 ile 8,162 arasında değişmektedir. Ayrıca elektrotun oldukça geniş bir lineer aralığa sahip olduğu gözükmemektedir.

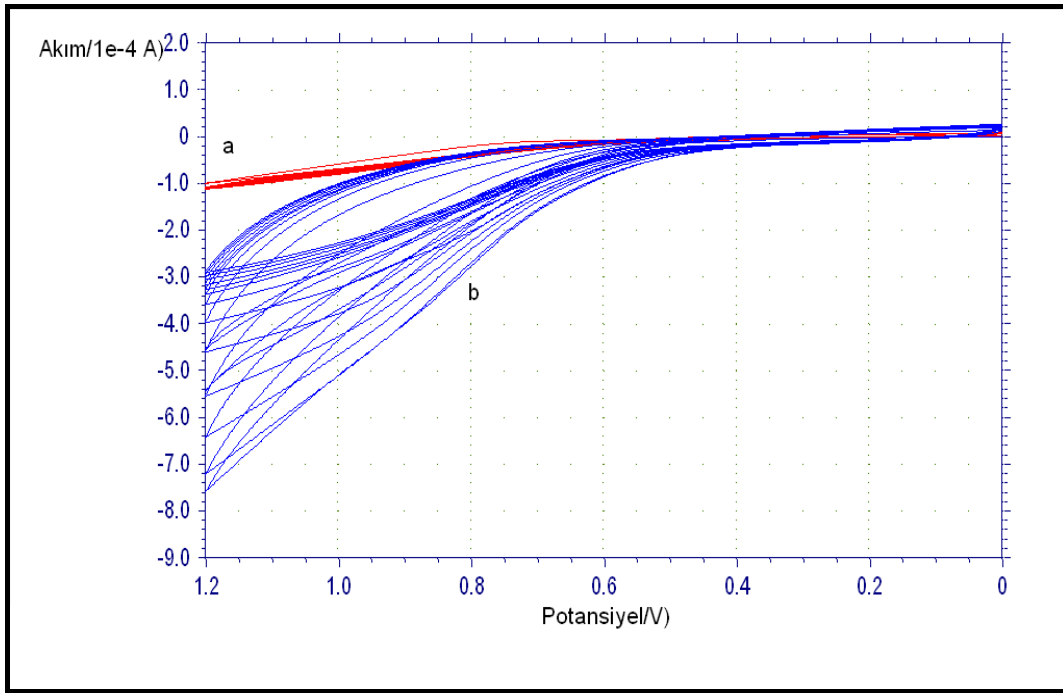
Hazırlanan çalışma elektrotunun, Bölüm 5.3.1’de çalışma bulguları verilen Ppy/CNT/Tyr/GC elektrot ile pyrokatekol ve katekol bileşiği hariç bazı farklı fenol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Pyrokatekol ve katekol bileşiklerinde hesaplanan analitik parametreler bakımından Ppy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotunun daha verimli olduğu bulunmuştur. Belirleme limitleri, hassasiyet ve relatif standart sapma bakımından CNT modifiye edilmiş elektrot daha fazla bir performans göstermiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da CNT modifikasyonu ile yüksek stabilite, daha iyi bir iletkenlik ve seçicilik sağlandığı belirtilmiştir (Li vd., 2006; Salimi vd., 2005; Rivas vd., 2007).

Çizelge 5.3 PPy /Tyr /GC çalışma elektrotu için analitik parametreler

<i>Fenolik Tür</i>	<i>R²</i>	<i>Hassasiyet (nA/μM)</i>	<i>Lineer aralık (μM)</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>Std. Sapma (nA)</i>	<i>%RSD</i>
fenol	<i>Tepki yok</i>					
<i>p</i>-benzokinon	0,99	10	5-130	0,743	±2,477	2,615
hidrokinon	0,99	3	5-35	0,2425	±4,041	3,494
2,6 dimetoksifenol	<i>Tepki yok</i>					
2-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
3-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
2-aminofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-aminofenol	<i>Tepki yok</i>					
pyrokatekol	0,99	4	15-75	1,132	±1,510	8,162
guaiakol	<i>Tepki yok</i>					
<i>m</i>-kresol	<i>Tepki yok</i>					
<i>o</i>-kresol	<i>Tepki yok</i>					
<i>p</i>-kresol	<i>Tepki yok</i>					
katekol	0,99	3	5-120	0,4472	±0,4472	4,141
4-asetamidofenol	<i>Tepki yok</i>					
pyrogallol	0,99	30	5-35	0,4115	±4,115	3,139
4-metoksifenol	<i>Tepki yok</i>					

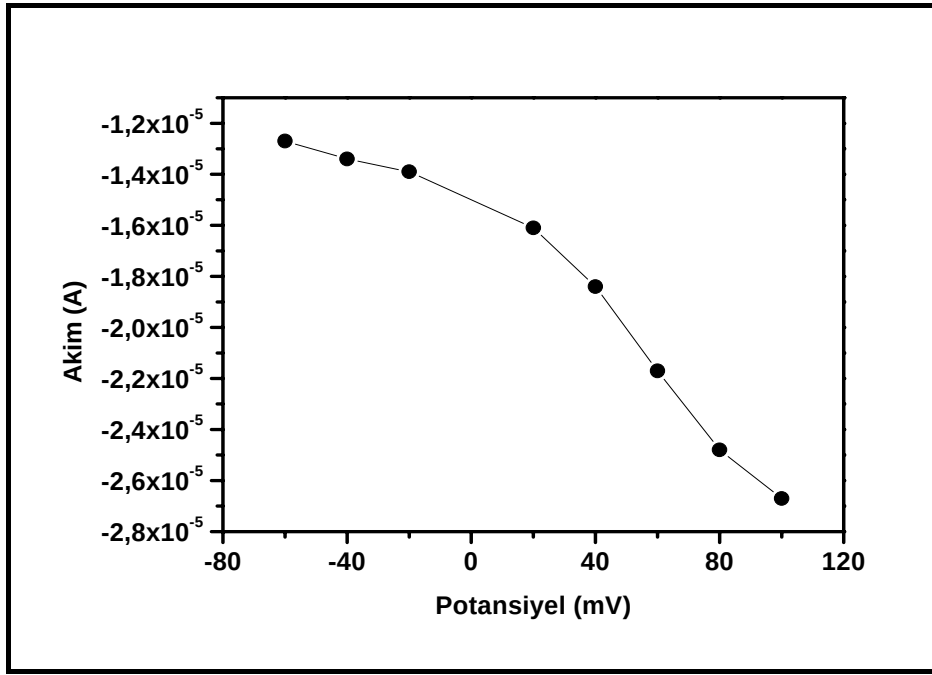
5.3.3 Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate / Polipirol / Karbon nanotüp/ Karbodiimid/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC} Çalışma Elektrodu Bulguları

Bölüm 4.3.3.2’de hazırlanışı anlatılan çalışma elektrotu kesikli sistemde 18 farklı fenol türünün tespit edilebilmesi için kullanılmıştır. Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC ile Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotlarının elektropolimerizasyonlarına ait dönüşümlü voltametri grafikleri karşılaştırmalı olarak Şekil 5.28’de verilmiştir.



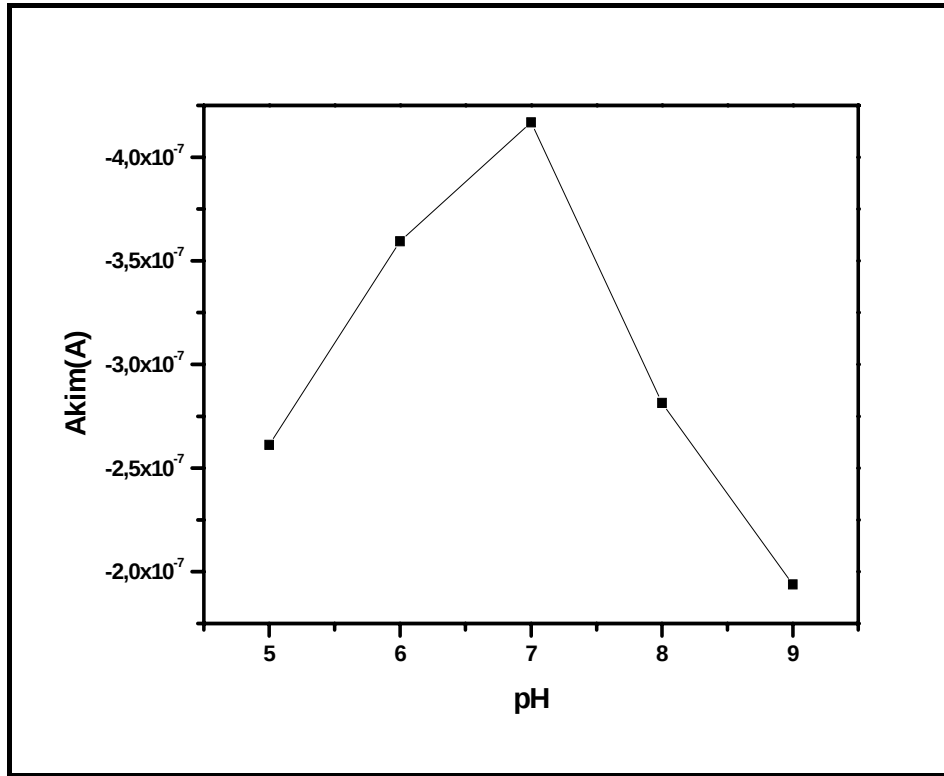
Şekil5.28 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC (a); Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC(b) çalışma elektrotları dönüşümlü voltametri eğrisi

CNT modifikasyonu ile hazırlanan elektrotun kaplama esnasındaki akım değerlerinin Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC elektrotuna göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Hazırlanan çalışma elektrotu için optimum potansiyel ve optimum pH çalışmaları yapılmıştır. Farklı çalışma potansiyellerinde Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotunun 200µM konsantrasyonuna sahip hidrokinon eklemelerine vermiş olduğu tepki Şekil 5.29’da gösterilmiştir.



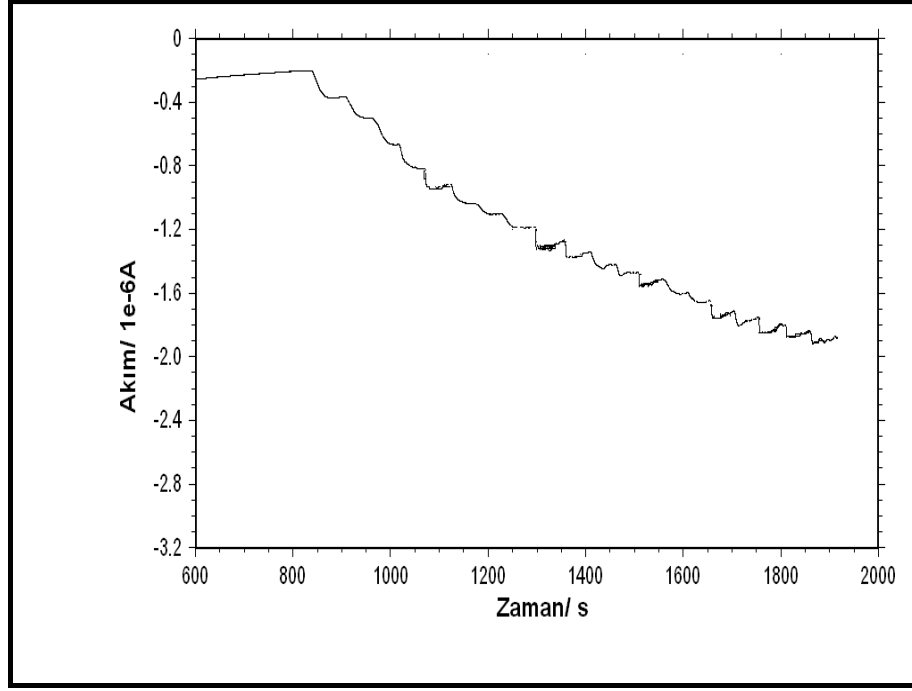
Şekil 5.29 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Buna göre hazırlanan elektrot da en yüksek akım değeri +100mV'da elde edilmiş olup optimum potansiyel olarak bundan sonraki çalışmalarda bu değer kullanılmıştır. Yine 200 μ M konsantrasyonuna sahip olan hidrokinon çözeltisi optimum pH'nın tespiti için kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda hazırlanan çalışma elektrotu için en uygun pH değeri 7,0 olarak bulunmuştur (Şekil 5.30). Diğer fenol bileşikleri için aynı şartlarda yapılan denemelerde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle çalışma elektrotu ile yapılan diğer tüm deneyler de bu şartlar kullanılmıştır.

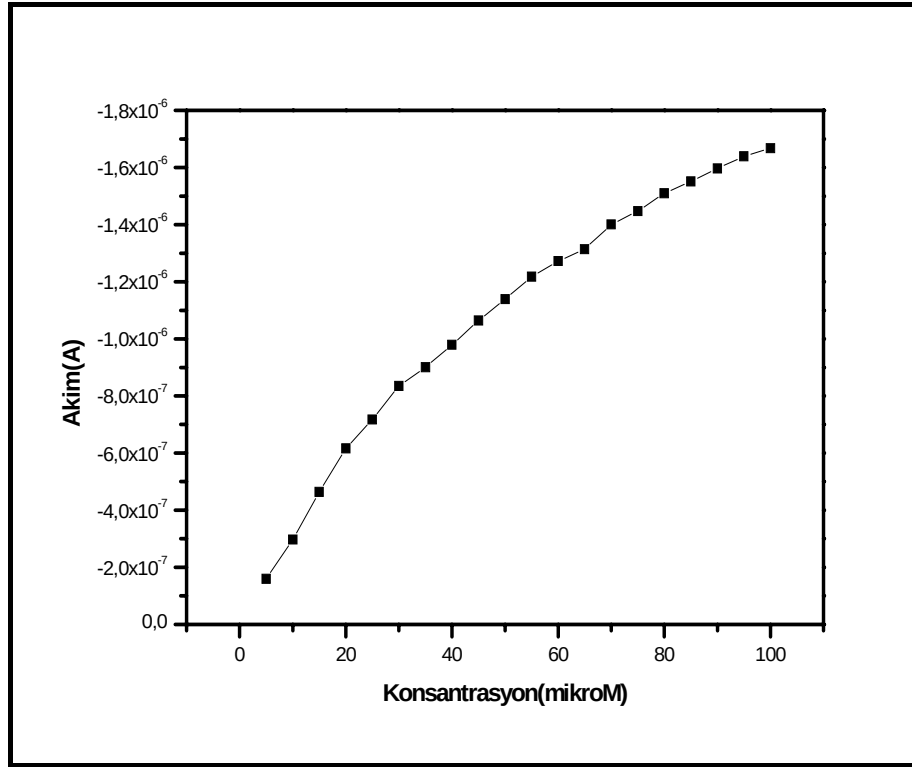


Şekil 5.30 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum pH'sının belirlenmesi

Kesikli ortamda, 600 rpm'lik karıştırma altında, 100 mV'luk (vs. Ag/AgCl) çalışma potansiyelinde, 4-aminofenol bileşiği hariç ,her bir fenol bileşiği için 5 μ M konsantrasyondan başlamak üzere düzenli olarak artan konsantrasyonlarda reaksiyon ortamına eklemeler yapılmış ve akım değişimleri gözlenmiştir. 4-aminofenol bileşiği için 20mM'lık çözeltiden 2 μ M konsantrasyonundan başlayarak düzenli olarak arttırılarak eklemeler yapılmıştır. Bu denemelere ait akım zaman değişimleri ve kalibrasyon eğrileri Şekil 5.31(a,b), Şekil 5.32, Şekil 5.33, Şekil 5.34, Şekil 5.35 ve Şekil 5.36'da verilmiştir.

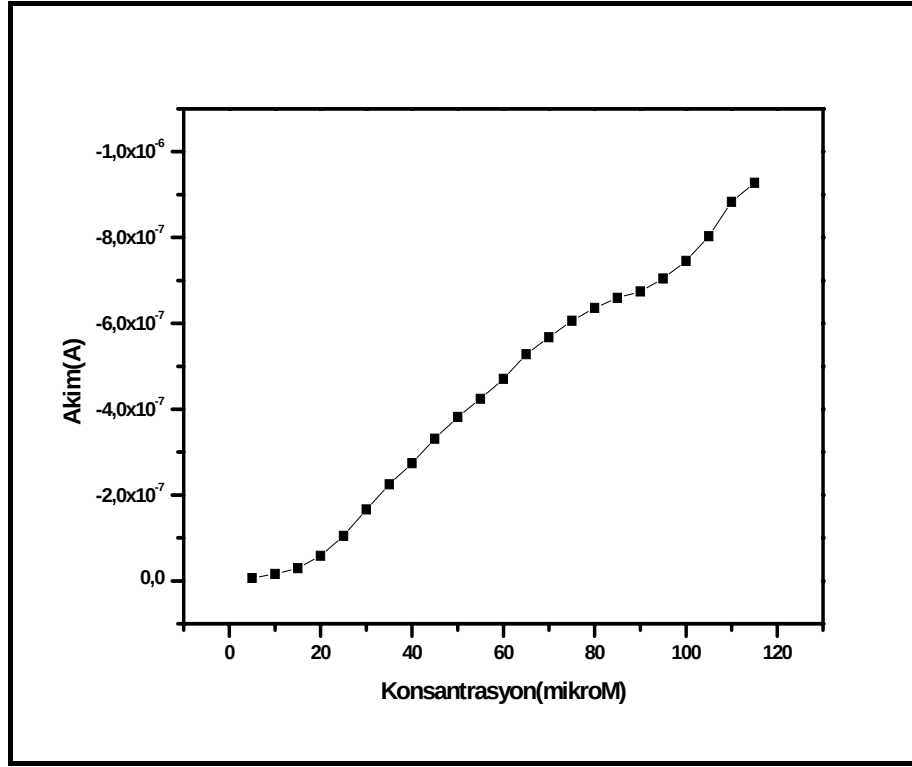


(a)

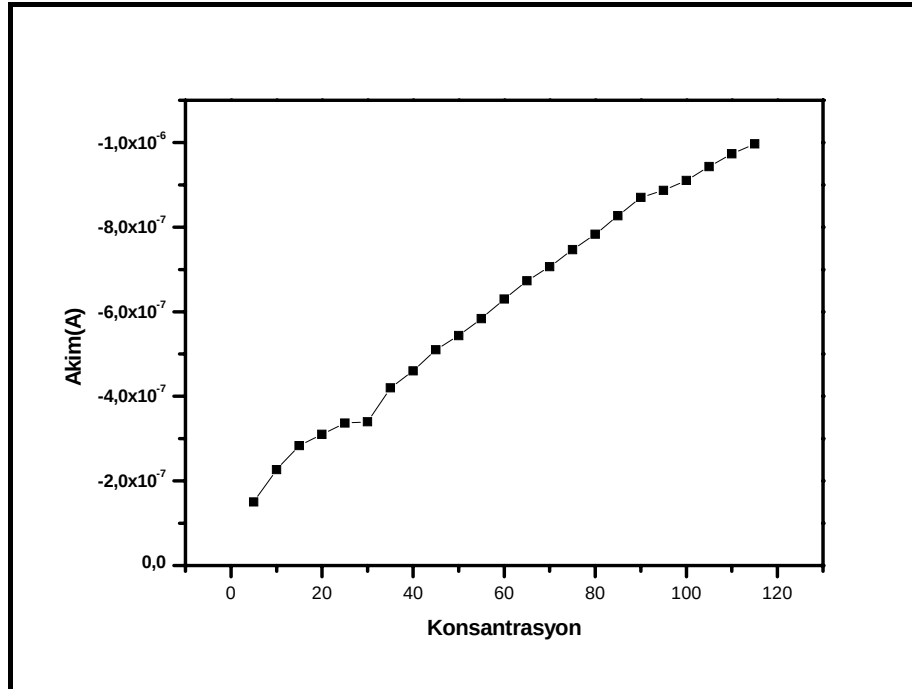


(b)

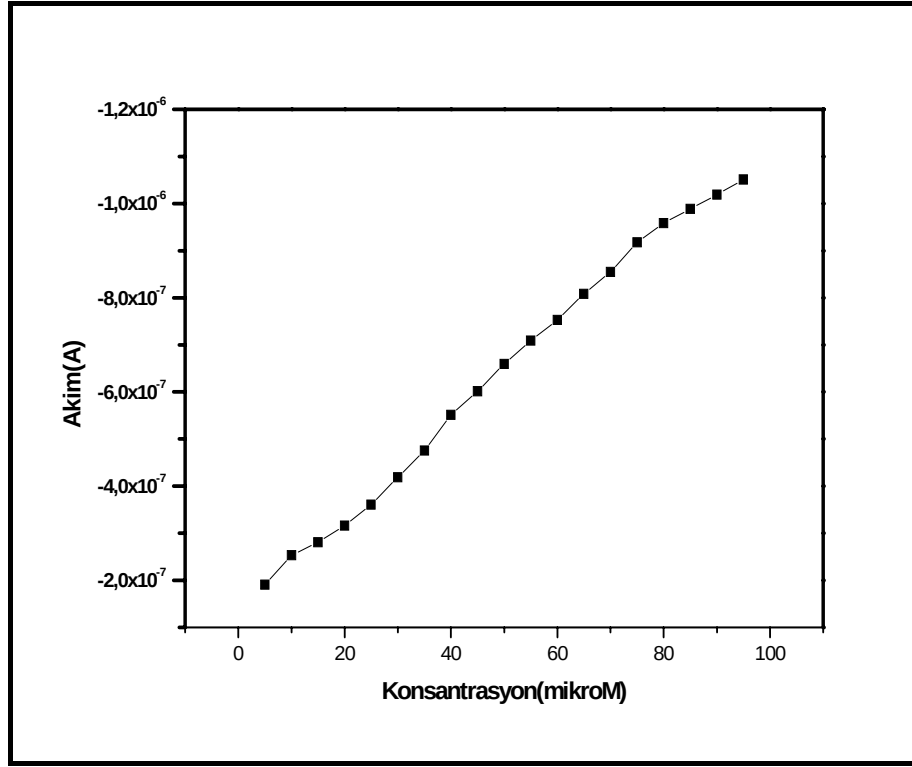
Şekil 5.31 Hidrokinon için(a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)



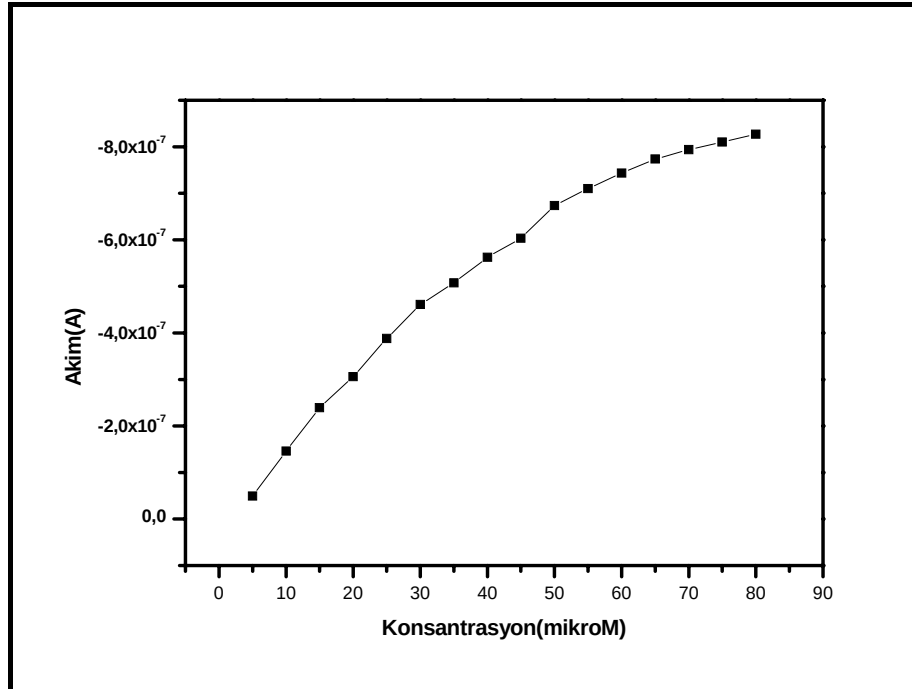
Şekil 5.32 p-benzokinon kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)



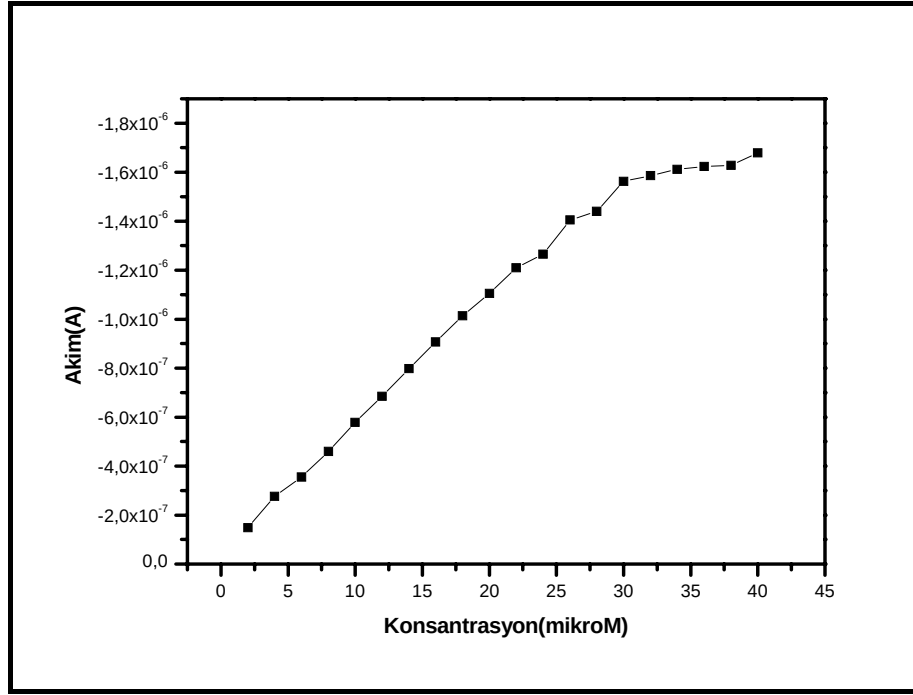
Şekil 5.33 Katekol akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)



Şekil 5.34 Pyrokatekol kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)

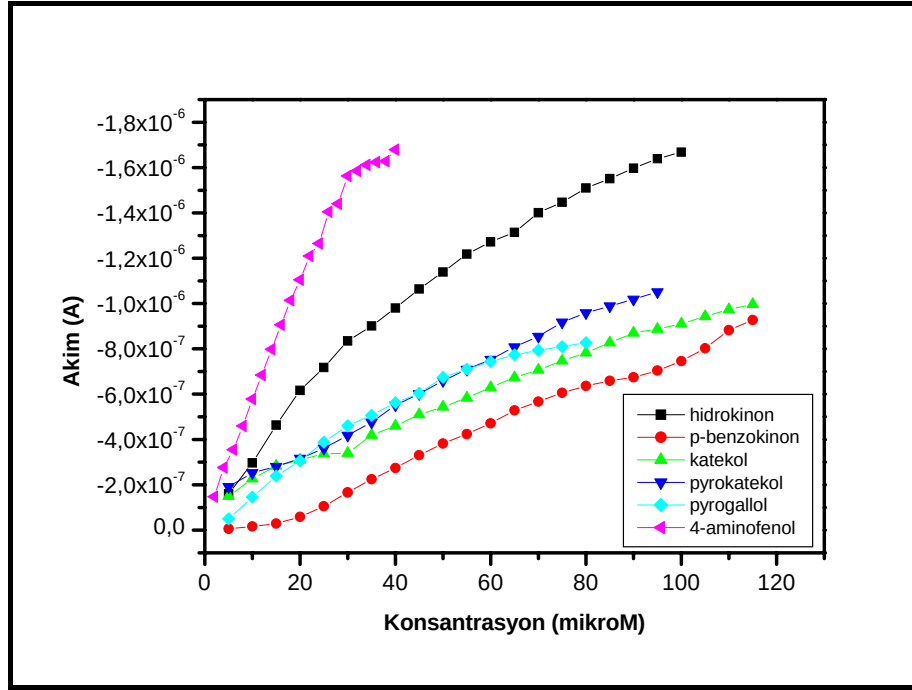


Şekil 5.35 Pyrogallol kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)



Şekil 5.36 4-aminofenol kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)

Hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmış analitik parametreler Çizelge 5.4’de verilmiştir. Hazırlanan çalışma elektrodunun, 18 fenol bileşiği içinden, pyrokatekol, p-benzokinon, pyrogalol, 4-aminofenol, katekol ve hidrokinon bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir.. Pyrokatekol, p-benzokinon, pyrogalol, 4-aminofenol, katekol ve hidrokinon bileşikleri için elektrodun cevap süreleri sırasıyla; 5, 50, 12, 6, 4 ve 6 s olarak bulunmuştur. Literatürde iletken polimerlerle hazırlanan çeşitli çalışma elektrotları için 30 s’den daha fazla bir cevap süresi elde edilmiştir (Rajesh ve Kaneto, 2005; Rajesh vd., 2004a). Li ve arkadaşları hazırlamış oldukları ZnO/chitosan/Tyr elektrotu ile katekol için cevap süresini 10 s olarak bulmuşlardır (Li vd., 2006). Buradan, Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC elektrotun cevap süresinin oldukça kısa olduğu görülmektedir.



Şekil 5.37 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması (pH=7,0; V=+100mV)

Çizelge 5.4'deki değerler incelendiğinde hazırlanan biyosensöre tepki veren fenol bileşikleri arasında, katekolün en düşük hassasiyete, 4-aminofenol'ün ise en iyi hassasiyet değerine sahip olduğu açıkça görülmektedir. Ayrıca 4-aminofenol bileşiğinin oldukça düşük belirleme limitine ($0,0976 \mu\text{M}$) ve relatif standart sapma değerine (%1,532) sahip olduğu gözlenmiştir. Hassasiyet değerlerine bakıldığında 4-aminofenolün en yüksek hassasiyete sahip olduğu görülmektedir. 4-aminofenol, hidrokinon, p-benzokininon, katekol, pyrokatekol ve pyrogallol için bulunan hassasiyet değerleri sırasıyla 50, 10, 9, 8, 10 ve 10 nA/ μM şeklindedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli fenol bileşikleri için hassasiyet değerleri 0,5-76,404 $\mu\text{A}/\text{mM}$ olarak verilmiştir (Rajesh vd., 2004b; Zhau vd., 2006; Zejli vd., 2008). Sonuç olarak biyosensör uygun hassasiyet değeri, düşük belirleme limiti, geniş lineer aralık, hızlı cevap süresi ve güvenilir aralıkta ölçüm stabilitesi göstermiştir.

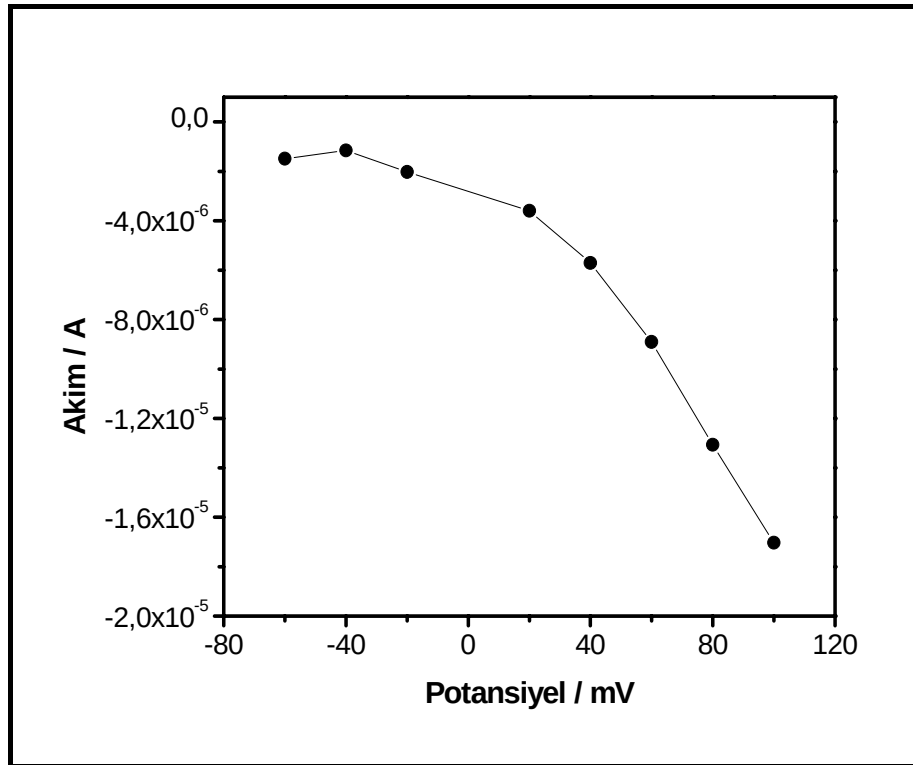
Yapılan düzenli ölçümlerde 60 gün sonunda biyosensörün aktivitesini % 43 oranında kaybettiği gözlenmiştir.

Çizelge 5.4 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodu analitik parametreler

<i>Fenolik Tür</i>	<i>R²</i>	<i>Hassasiyet</i> (<i>nA/μM</i>)	<i>Lineer aralık</i> (<i>μM</i>)	<i>LOD</i> (<i>μM</i>)	<i>Std. Sapma</i> (<i>nA</i>)	<i>%RSD</i>
fenol	<i>Tepki yok</i>					
<i>p</i>-benzokinon	0.99	9	5-115	0,7279	±2,184	4,505
hidrokinon	0.98	10	20-100	0,7225	±2,41	5,549
2,6 dimetoksifenol	<i>Tepki yok</i>					
2-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
3-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
2-aminofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-aminofenol	0.99	50	2-30	0,0976	±1,627	1,532
pyrokatekol	0.99	10	10-95	0,3502	±1,167	2,0426
guaiakol	<i>Tepki yok</i>					
<i>m</i>-kresol	<i>Tepki yok</i>					
<i>o</i>-kresol	<i>Tepki yok</i>					
<i>p</i>-kresol	<i>Tepki yok</i>					
katekol	0.99	8	10-115	0,5961	±1,590	3,596
4-asetamidofenol	<i>Tepki yok</i>					
pyrogallol	0.98	10	5-65	0,9906	±3,302	9,9
4-metoksifenol	<i>Tepki yok</i>					

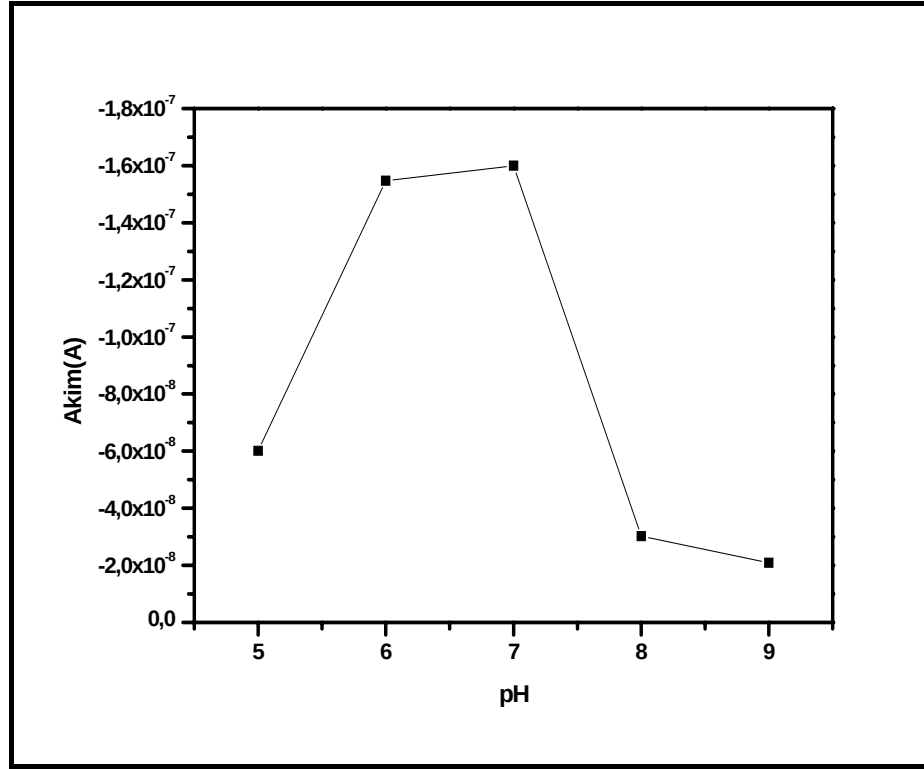
5.3.4 Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate / Polipirol / Karbodiimid/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC} Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

Bölüm 4.3.3.4’de hazırlanışı anlatılan elektrot için optimum potansiyel ve optimum pH çalışmaları yapılmış olup sonuçlar Şekil 5.38 ve Şekil 5.39’da verilmiştir. Farklı potansiyelerde siteme 200 μ M hidrokinon eklemesi yapılmış ve buna karşı elde edilen akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekilden de anlaşılabileceği gibi biyosensörün en yüksek akım değerini +100 mV’da vermiştir.



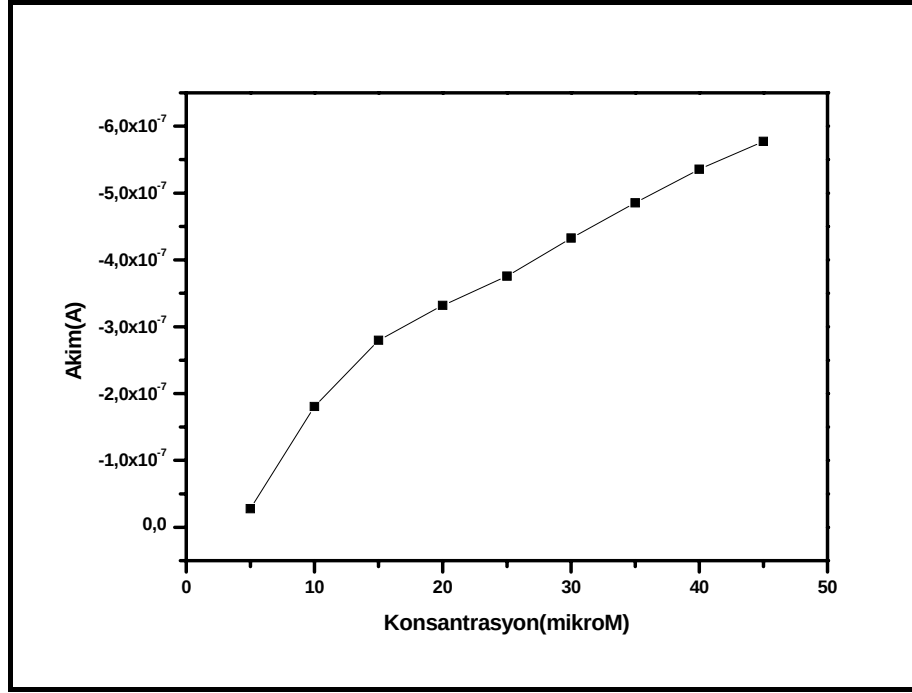
Şekil 5.38 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi (pH=7,0)

Optimum pH ise yine 7.0 olarak bulunmuştur. Bu elektrot ile yapılan diğer tüm deneyler de bu şartlar kullanılmıştır.

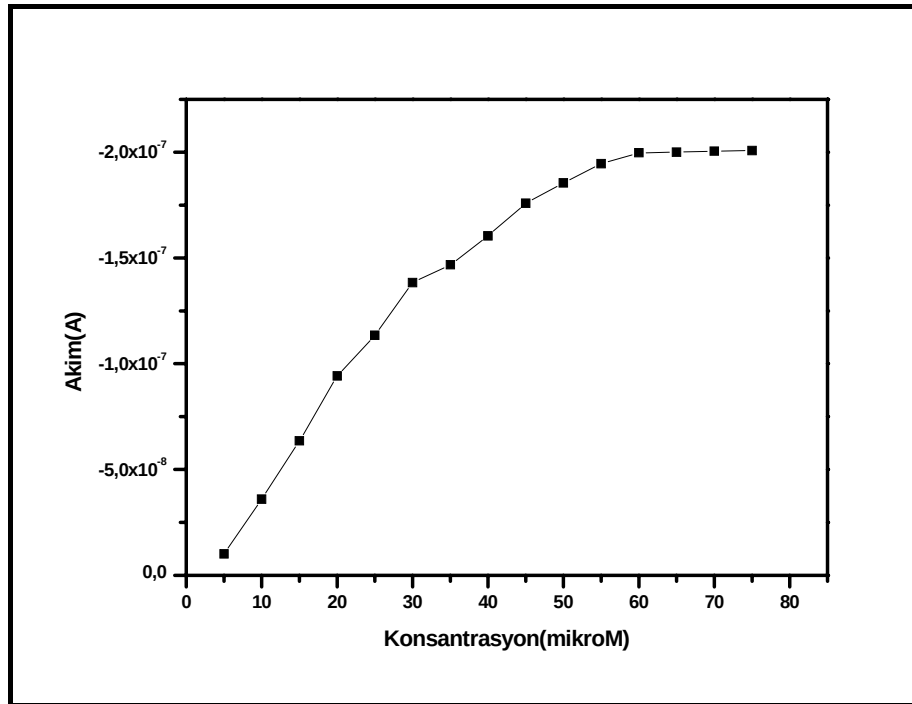


Şekil 5.39 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum pH'sının belirlenmesi ($V = +100$ mV, pH=7,0)

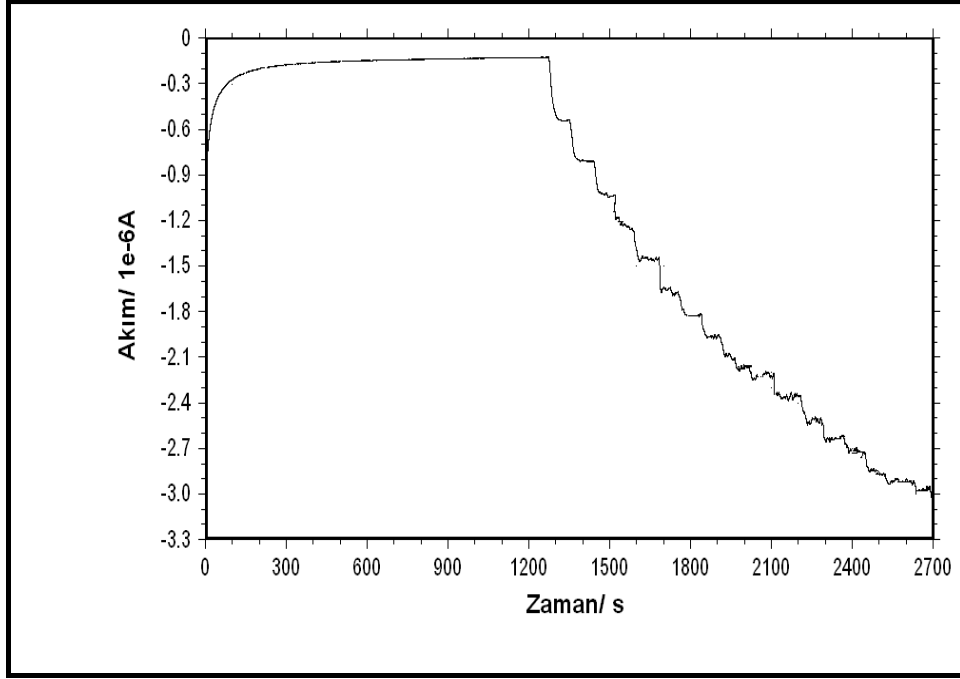
Bahsedilen deney koşullarında çalışma elektrodunun yine 18 fenol bileşiğine (fenol, katekol, p-benzokinon, m-kresol, o-kresol, p-kresol, guaiakol, 4-aminofenol, 2,6-dimetoksifenol, 2-klorofenol, 3-klorofenol, 4-klorofenol, hidrokinon, 4-asetamidofenol, pyrogallol, 4-metoksifenol, pyrokatekol, 2-aminofenol) verdiği tepki incelenmiştir. Reaksiyon için ortama 200 mM'lık stok fenol bileşiği çözeltilerinden 5 μ M'dan başlayarak düzenli olarak eklemeler yapılmış zamana karşı elde edilen akım değerleri ve hazırlanan kalibrasyon eğrileri Şekil 5.40, Şekil 5.41, Şekil 5.42(a,b), Şekil 5.43, Şekil 5.44 ve Şekil 5.45'de verilmiştir.



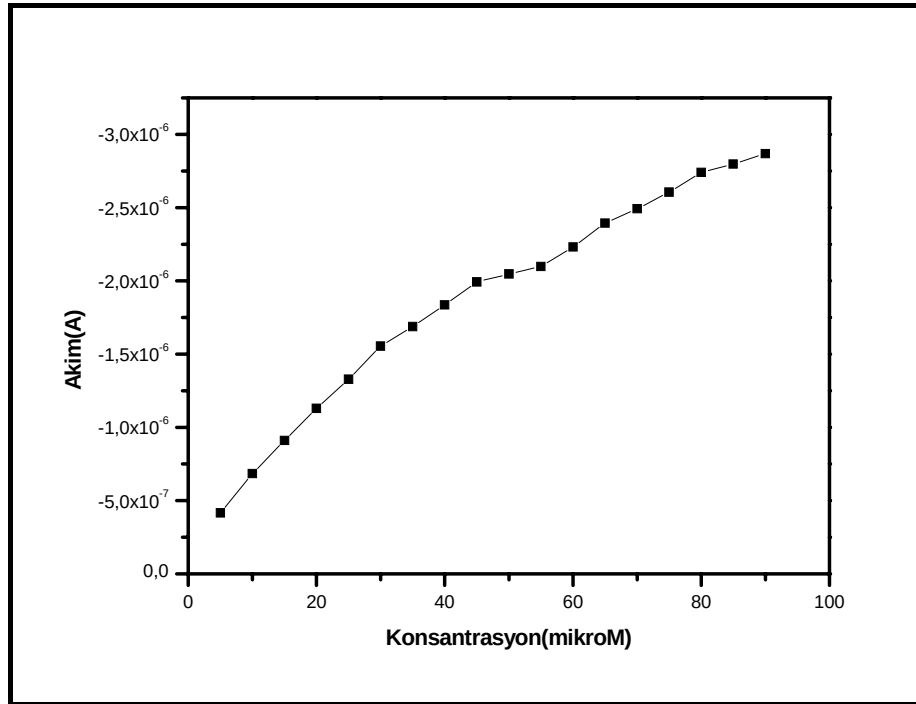
Şekil 5.40 4-aminofenol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)



Şekil 5.41 Katekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)

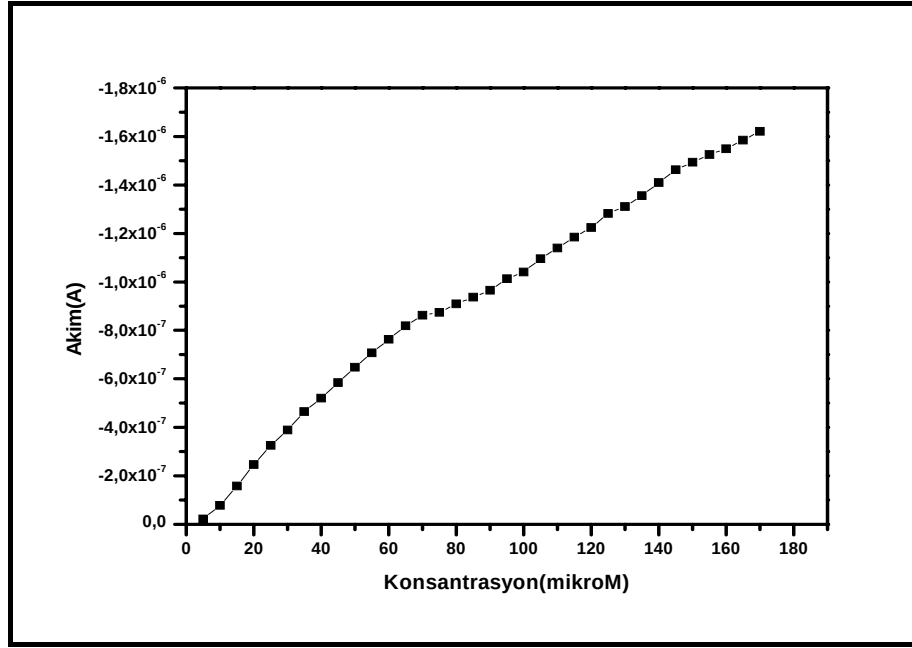


(a)

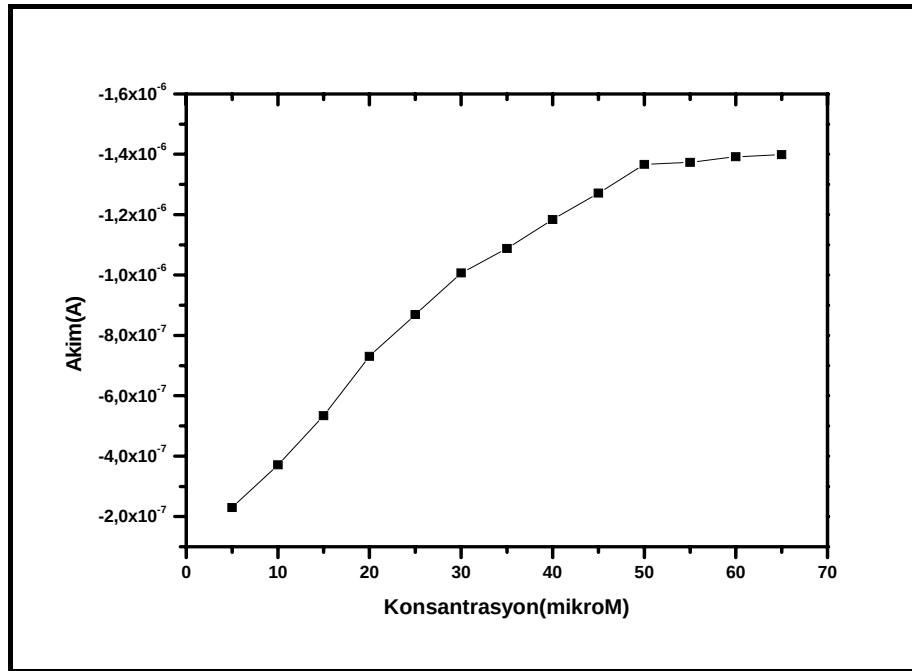


(b)

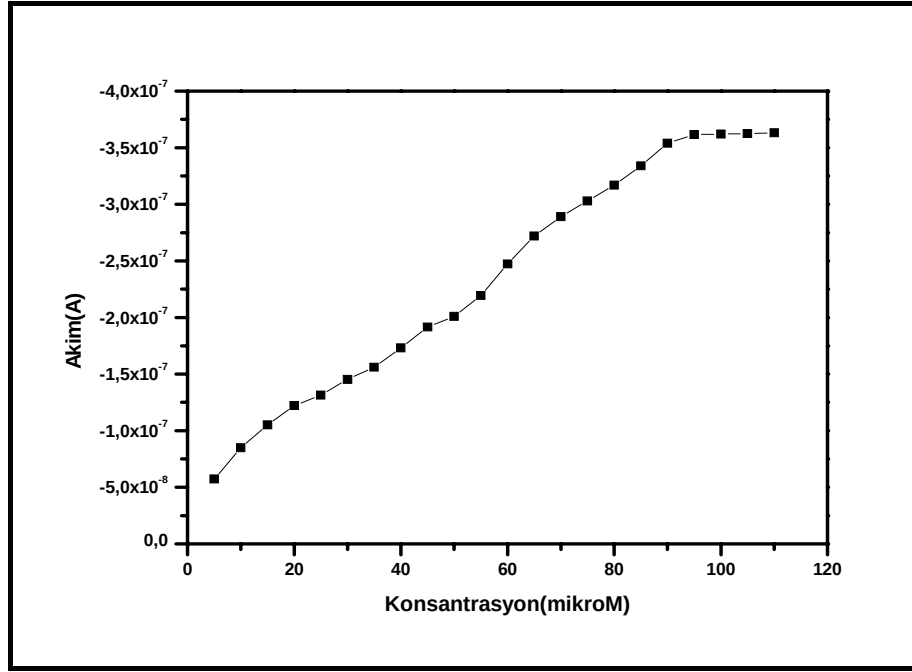
Şekil 5.42 Hidrokinon için(a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100mV)



Şekil 5.43 p-benzokinin için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100 mV)

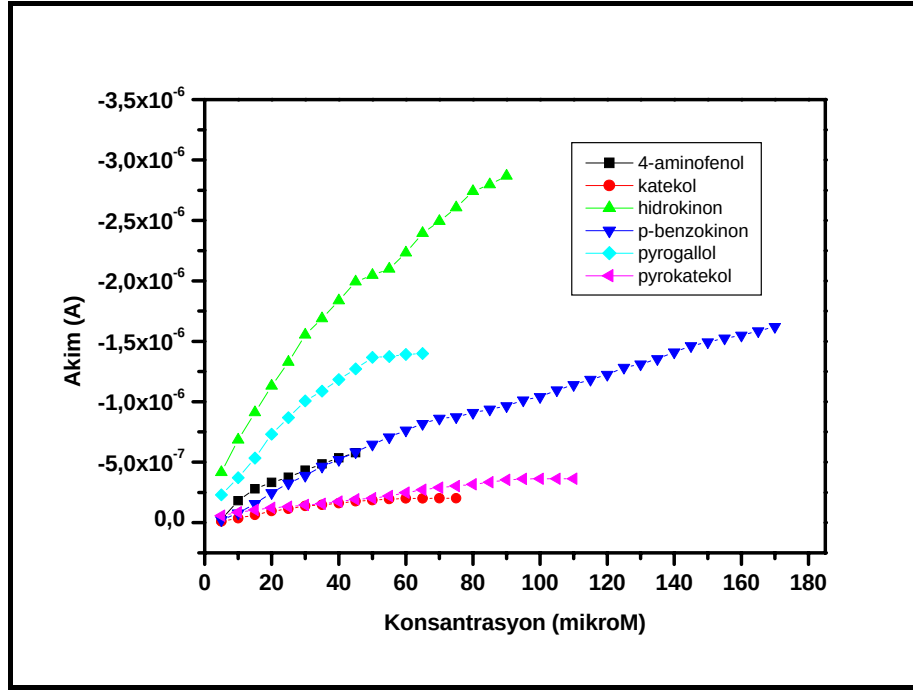


Şekil 5.44 Pyrogallol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100 mV)



Şekil 5.45 Pyrokatekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=100 mV)

Hazırlanan biyosensörün 4-aminofenol, hidrokinon, katekol, p-benzokinon, pyrokatekol ve pyrogallol bileşiklerine yanıt verdiği gözlenmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin birbirleriyle kıyaslanması Şekil 5.46'da verilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrileri yardımıyla bu bileşikler için analitik parametreler hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 5.5'de verilmiştir. Yapılan hesaplamalarda bu çalışma elektrotu için, hidrokinonun en yüksek hassasiyet değerine (20 nA/μM) sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan araştırmalarda bir biyosensör için farklı fenol bileşikleri arasında, farklı hassasiyet değerlerinin elde ediliyor olması, tyrosinaz enziminin her bir fenol bileşiğine karşı farklı afinitelere sahip olmasıyla açıklanmıştır (Zhao vd., 2006).



Şekil 5.46 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması (pH=7,0; V=+100mV)

Hazırlanan biyosensörün, Bölüm 5.3.3’de deney sonuçları verilen Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/CNT/GC elektrot ile aynı fenol bileşiklerine tepki verdiği görülmüştür. Hidrokinon bileşiğinin hassasiyeti Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/CNT/GC elektrotta 50 nA/µM iken Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC elektrotta ise 20 nA/µM olarak bulunmuştur. Genel olarak diğer fenol bileşiklerinin de karşılaştırılması yapılırsa hassasiyet, belirleme limiti ve relatif standart sapma gibi parametreler bakımından CNT ile hazırlanan elektrotun değerlerinin diğerine göre daha iyi olduğu görülebilir.

Yapılan düzenli ölçümlerde 40 gün sonunda biyosensör aktivitesinin %42’sini, 60 gün sonunda ise %68’ini kaybettiği gözlenmiştir.

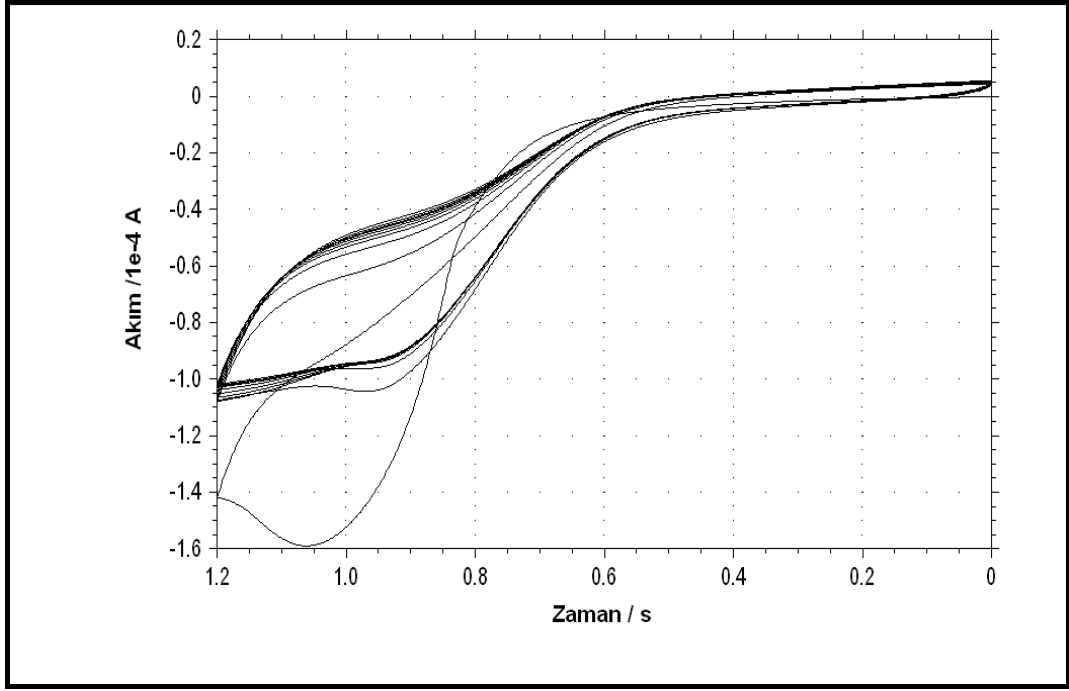
Çizelge 5.5 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC çalışma elektrotu analitik parametreleri

<i>Fenolik Tür</i>	<i>R²</i>	<i>Hassasiyet (nA/μM)</i>	<i>Lineer aralık (μM)</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>Std. Sapma (nA)</i>	<i>%RSD</i>
Fenol	<i>Tepki yok</i>					
p-benzokinon	0,98	9	5-170	0,5867	±1,760	4,080
Hidrokinon	0,98	20	20-90	1,212	±8,083	5,829
2,6 dimetoksifenol	<i>Tepki yok</i>					
2-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
3-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
2-aminofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-aminofenol	0,99	10	10-45	0,39	±1,300	2,51
Pyrokatekol	0,98	3	5-95	0,8044	±0,800	4,565
Guaiakol	<i>Tepki yok</i>					
m-kresol	<i>Tepki yok</i>					
o-kresol	<i>Tepki yok</i>					
p-kresol	<i>Tepki yok</i>					
Katekol	0,99	4	5-55	1,023	±1,363	5,216
4-asetamidofenol	<i>Tepki yok</i>					
Pyrogallol	0,99	10	10-45	0,39	±1,300	2,510
4-metoksifenol	<i>Tepki yok</i>					

5.4 Elektropolimerizasyon ile Hazırlanan Elektrot Bulguları

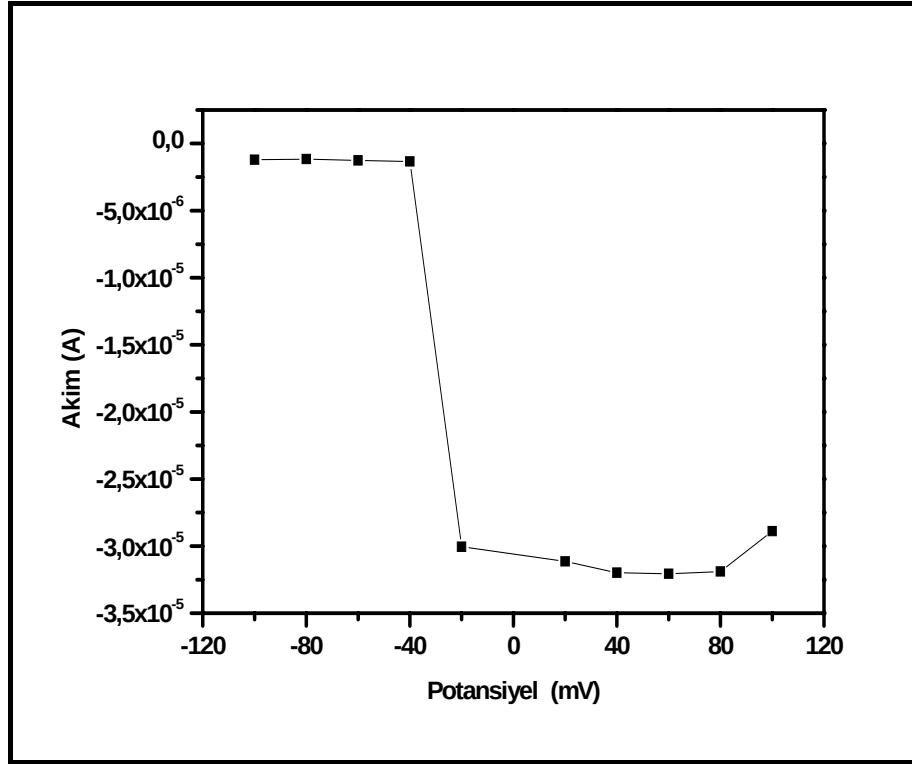
5.4.1 Polipirol / Karbon nanotüp/ Tyrosinaz/ Cam karbon (PPy / CNT / Tyr / GC) Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

Bölüm 4.3.4.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan elektrot kesikli üçlü elektrot sisteminde çalışılmıştır. Elektrotun hazırlanması sırasında yapılan kaplamaya ait elektropolimerizasyonun dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 5.47’de gösterilmiştir.



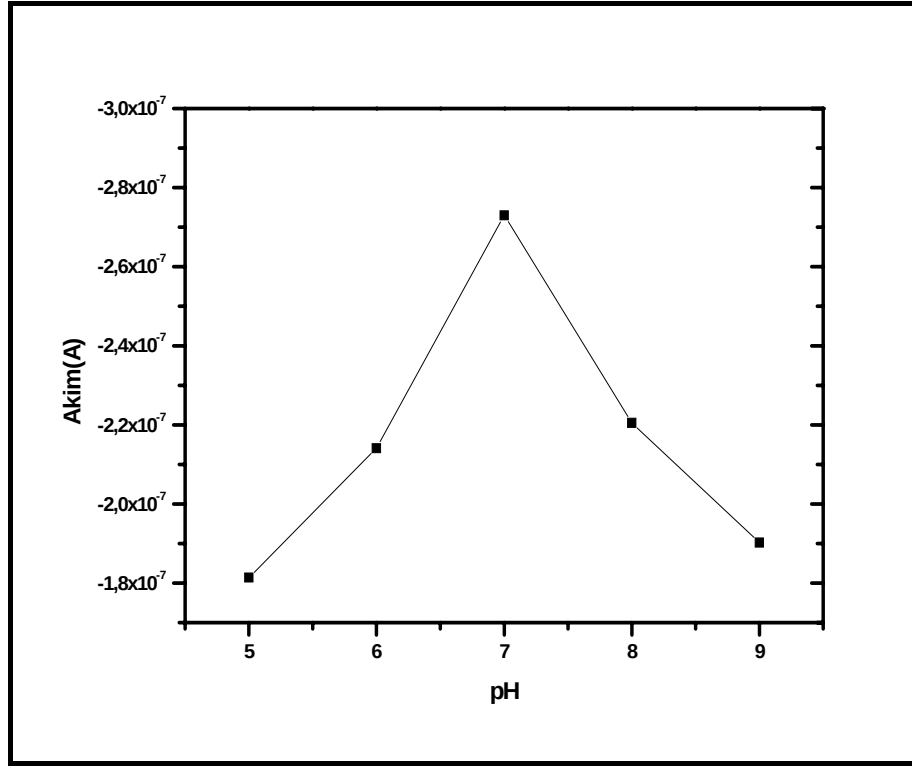
Şekil 5.47 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotu dönüşümlü voltametri eğrisi

Farklı çalışma potansiyellerinde PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun 10 μ L ,200mM’lık pyrokatekol eklemelerine olan tepkisi Şekil 5.48’de gösterilmiştir. İndirgenme akımının 0 mV’den itibaren -50 mV’a kadar hızlı bir şekilde arttığı ve daha negatif potansiyellerde indirgenme akımındaki bu artışın yavaşladığı görülmüştür. Bu nedenle çalışma potansiyeli -50 mV seçilmiştir. Pyrokatekol dışındaki diğer fenolik türler için de aynı deneyler yapılmış ve benzer sonuçlara ulaşılmıştır.



Şekil 5.48 PPy/Tyr/CNT/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi (pH=7,0)

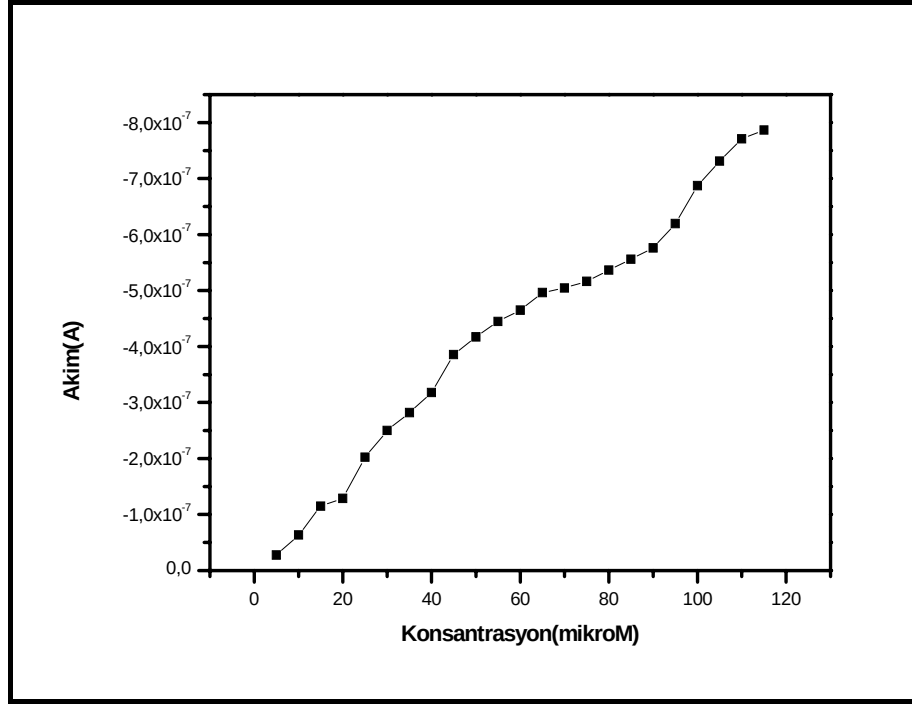
Optimum pH değerini elde edebilmek için, 200 mM pyrokatekol çözeltisi farklı pH'lardaki reaksiyon ortamına, 200 μ M konsantrasyonunda eklenmiştir. pH etkisi Şekil 5.49'de gösterilmiştir. Denemeler sonunda optimum pH=7,0 olarak bulunmuştur. Diğer fenol bileşikleri için de pH=7,0 reaksiyon ortamı kullanılmıştır. Pyrokatekol dışındaki diğer fenolik türler için de aynı deneyler yapılmış ve benzer sonuçlara ulaşılmıştır.



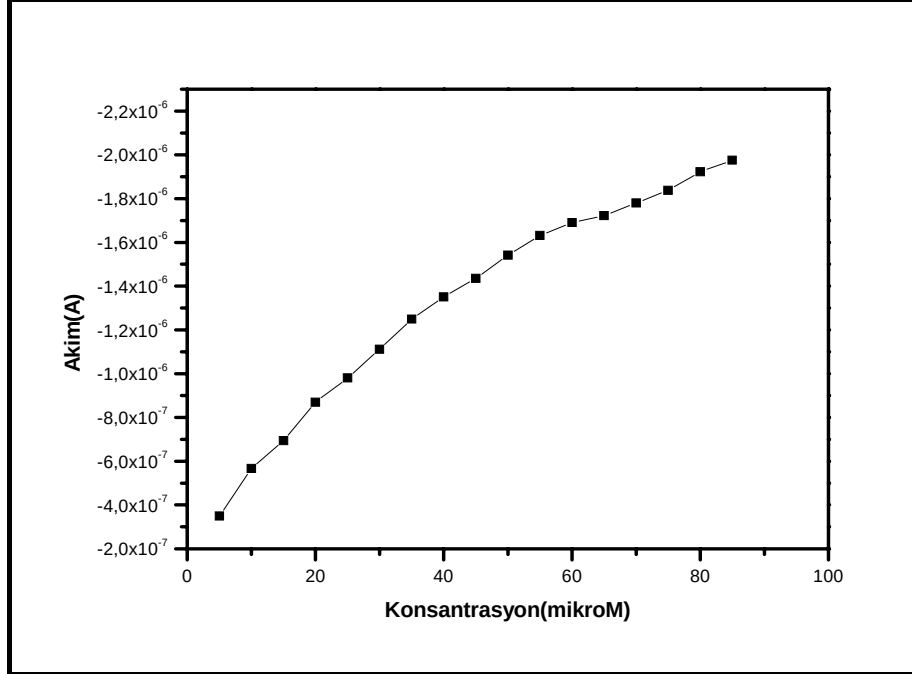
Şekil 5.49 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum pH'sının belirlenmesi pyrokatekol ile

Optimize edilmiş deney koşullarında çalışma elektrodunun 18 fenol bileşiğine (fenol, katekol, *p*-benzokinin, *m*-kresol, *o*-kresol, *p*-kresol, guaiakol, 2,4-dimetilfenol, 2,6-dimetoksifenol, 2-klorofenol, 3-klorofenol, 4-klorofenol, hidrokinon, 4-asetamidofenol, pyrogallol, 4-metoksifenol, pyrokatekol, 2-aminofenol) verdiği tepki incelenmiştir. Kesikli ortamda, 600 rpm'lik karıştırma altında, -50 mV'luk (vs. Ag/AgCl) çalışma potansiyelinde her bir fenol bileşiği için, 200 mM'lık stok çözeltilerinden, 5 µM konsantrasyondan başlamak üzere düzenli olarak artan konsantrasyonlarda reaksiyon ortamına eklemeler yapılmış ve akım değişimleri gözlenmiştir.

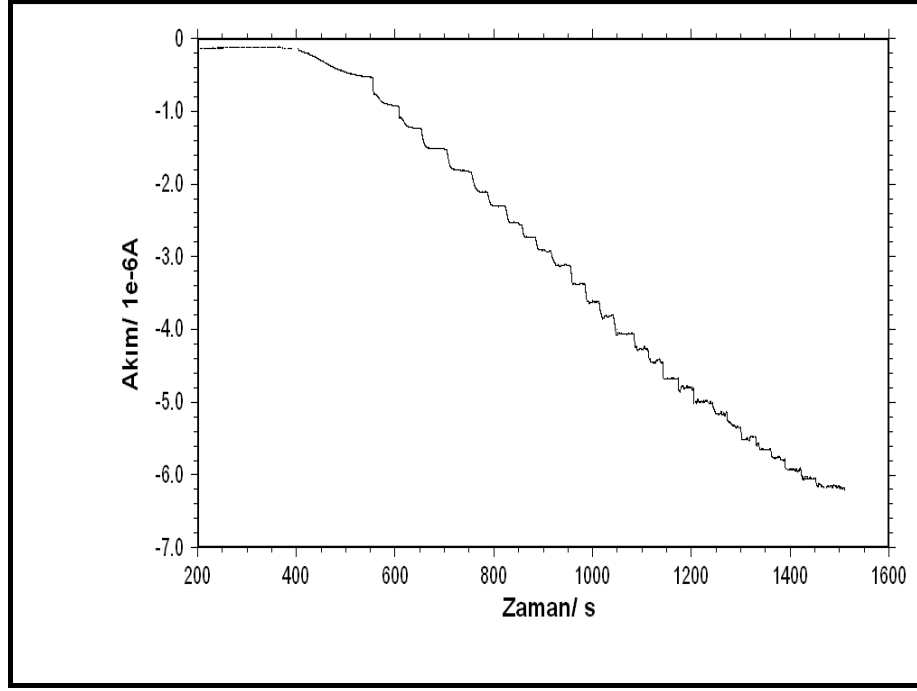
Hazırlanan çalışma elektrotuna tepki veren her bir fenolik konsantrasyonuna karşı elde edilen akım değişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Elde edilen veriler Şekil 5.50, Şekil 5.51, Şekil 5.52(a,b), Şekil 5.53 ve Şekil 5.54'de verilmiştir.



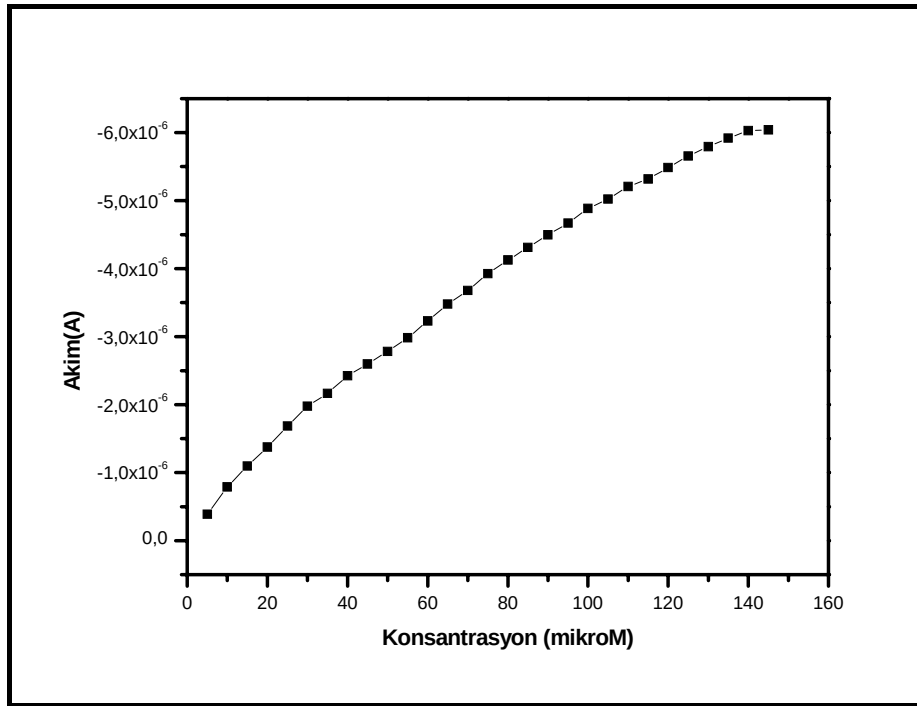
Şekil 5.50 4Aminofenol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50 mV)



Şekil 5.51 Katekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50 mV)

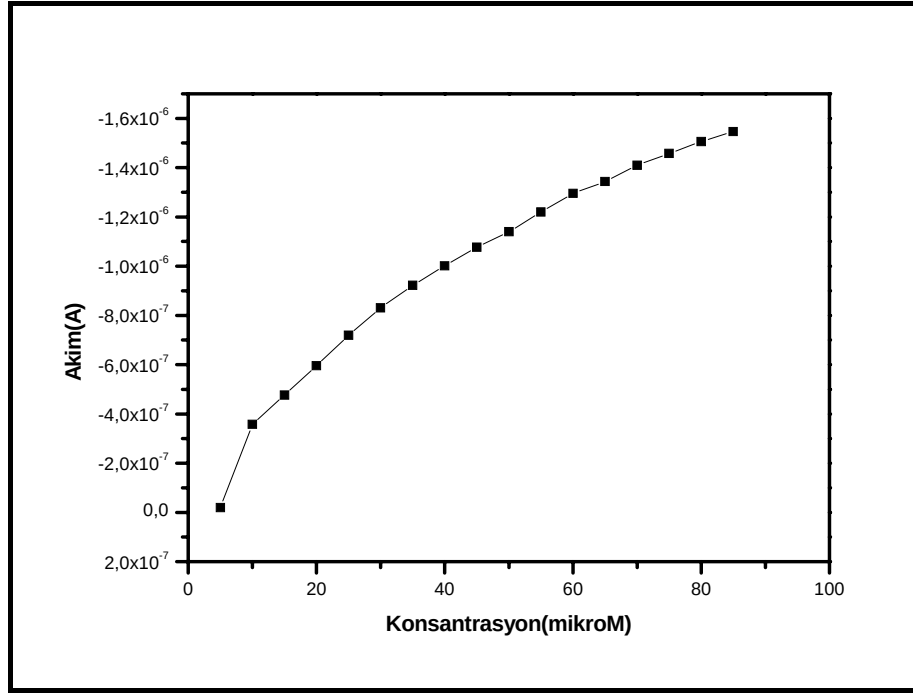


(a)

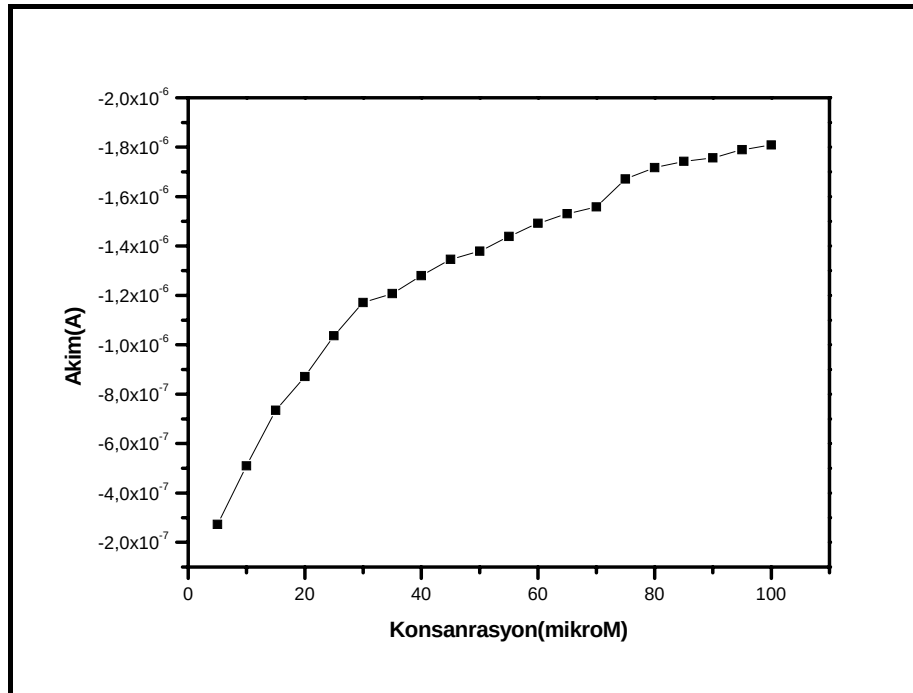


(b)

Şekil 5.52 Hidrokinon için(a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50 mV)

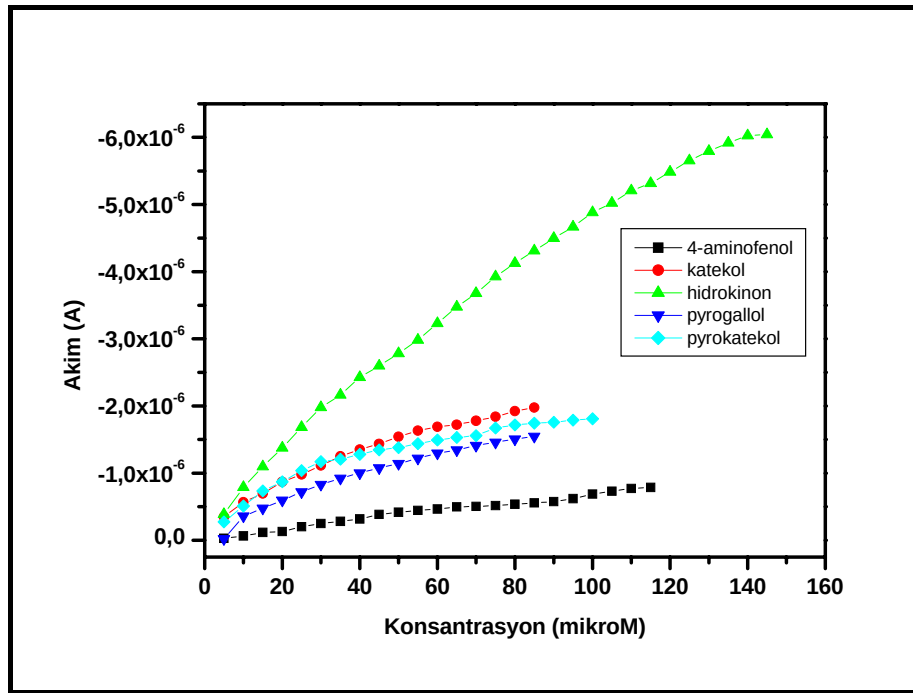


Şekil 5.53 Pyrogallol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50 mV)



Şekil 5.54 Pyrokatekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=-50 mV)

Hazırlanmış olan kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanan analitik parametreler Çizelge 5.6'da verilmiştir. Çalışma elektrotunun hidrokinon, pyrokatekol, katekol, pyrogallol ve 4-aminofenol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Çizelgeden de anlaşılabacağı gibi 4-aminofenol bileşiği diğer fenol bileşiklerine göre daha yüksek bir hassasiyet değerine sahiptir. Ancak genel olarak diğer enzim tutuklama yöntemiyle hazırlanan elektrotlarla kıyaslandığında hassasiyet değerlerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Hidrokinon, pyrokatekol, katekol, pyrogallol ve 4-aminofenol bileşikleri için belirleme limitleri sırasıyla 0,551, 1,952, 1,228, 0,03636 ve 1 μM olarak bulunmuştur. Belirleme limitleri bakımından en düşük değer görüldüğü gibi pyrogallol bileşiğine aittir. Relatif standart sapma (RSD) değerleri ise %2,928 ile %9,809 arasında değişmektedir. Ayrıca elektrotun oldukça geniş bir lineer aralığa sahip olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 5.55 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması (pH=7,0; V=-50mV)

Kalibrasyon eğrilerinin birbirleriyle olan kıyası Şekil 5.55'de verilmiştir. Hazırlanan çalışma elektrotunun, Bölüm 5.3.1'de çalışma bulguları verilen ve karbodiimid kullanılarak enzim tutklanması sağlanan, Ppy/CNT/Tyr/GC elektrot ile elektropolimerizasyon ile hazırlanan Ppy/CNT/Tyr/GC elektrotun ortak tepki verdiği fenol bileşiklerinin pyrokatekol ve katekol olduğu saptanmıştır. Buradan fenol bileşikleri için hazırlanan elektrotların bir seçiciliğe sahip olduğu sonucuna varılabilir. Elektrotlar arasında kıyaslama yapılarak elektropolimerizasyon

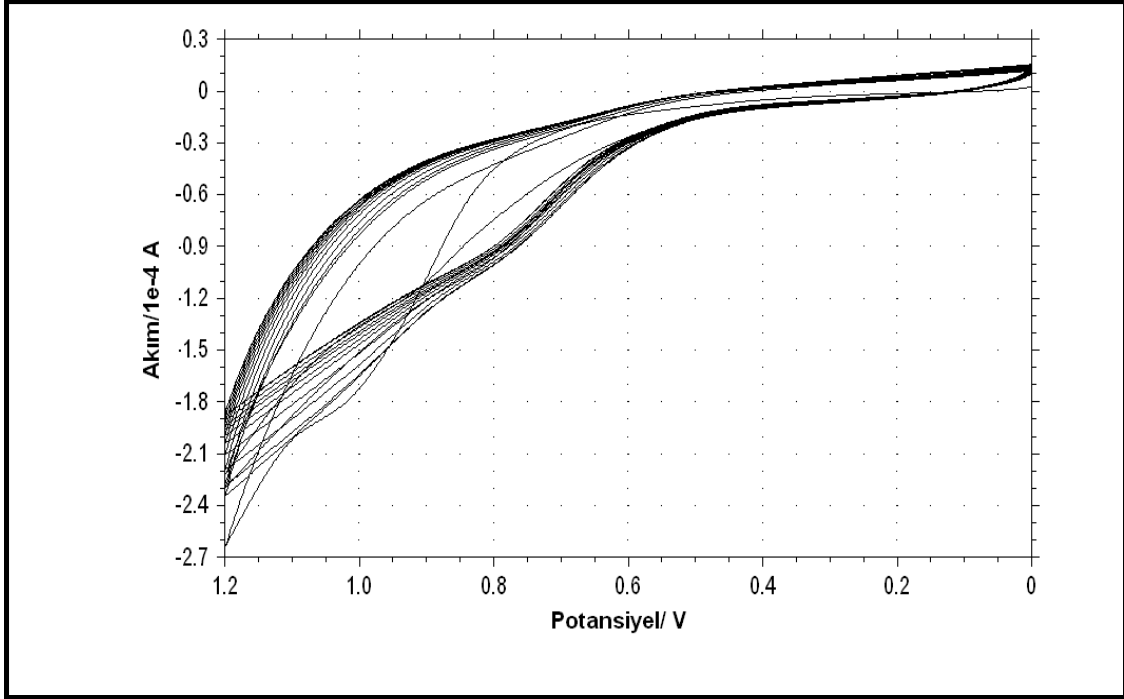
ile hazırlanan Ppy/CNT/Tyr/GC elektrotun hesaplanan analitik değerleri diğer elektrota göre daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca hazırlanan elektrotun cevap süreleri; pyrokatekol, katekol, 4-aminofenol, pyrogallol ve hidrokinon bileşikleri için sırasıyla 6, 5, 6, 5 ve 3 s olarak bulunmuştur. Karbodiimid kullanılarak enzim tutkulanması sağlanan, Ppy/CNT/Tyr/GC elektrot ile kıyaslandığında, elektropolimerizasyon ile hazırlanan Ppy/CNT/Tyr/GC elektrotun daha kısa cevap sürelerine sahip olduğu açıkça görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, biyosensör uygulamaları için uygulanan enzim tutuklama tekniklerinin seçiminin çok önemli olduğunu göstermiştir (Zhao vd., 2006; Himuro vd., 2009) Enzim tutuklama tekniği olarak hapsetme (Mishra vd., 1999), polyelektrolit kompleksi ile muamele (Yabuki vd., 2001) ve çapraz bağlama (Portaccio vd., 2006) gibi çeşitli teknikler kullanıldığı belirtilmiştir.

Çizelge 5.6 PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotu analitik parametreleri

<i>Fenolik Tür</i>	<i>R²</i>	<i>Hassasiyet (nA/μM)</i>	<i>Lineer aralık (μM)</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>Std. Sapma (nA)</i>	<i>%RSD</i>
fenol	<i>Tepki yok</i>					
p-benzokinon	<i>Tepki yok</i>					
hidrokinon	0,99	0,4	5-145	0,5510	±7,348	2,928
2,6 dimetoksifenol	<i>Tepki yok</i>					
2-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
3-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
2-aminofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-aminofenol	0,98	6	5-70	1	±2	6,116
pyrokatekol	0,98	0,1	30-105	1,952	±6,506	9,809
guaiakol	<i>Tepki yok</i>					
m-kresol	<i>Tepki yok</i>					
o-kresol	<i>Tepki yok</i>					
p-kresol	<i>Tepki yok</i>					
katekol	0,99	0,2	10-55	1,228	±8,185	8,268
4-asetamidofenol						
pyrogallol	0,99	0,02	5-70	0,03636	±2,424	3,126
4-metoksifenol	<i>Tepki yok</i>					

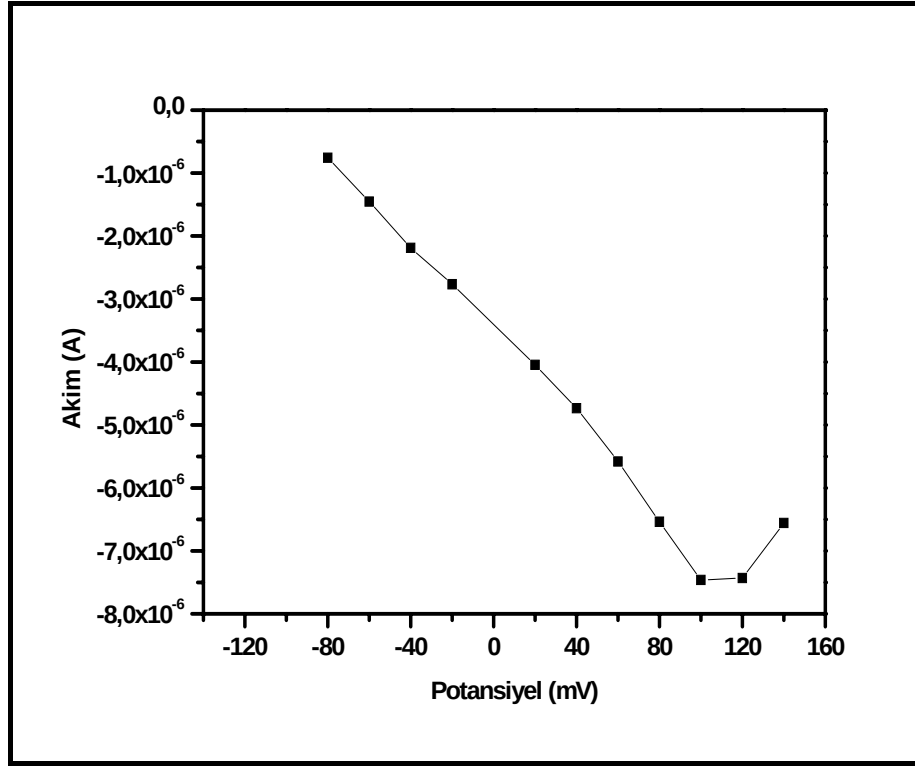
5.4.2 Poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate/ Polipirol/ Karbon nanotüp/ tyrosinaz/ Cam karbon {Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC} Çalışma Elektrotunun Hazırlanması

Bölüm 4.3.4.2’de hazırlanışı anlatılan çalışma elektrotu kesikli sistemde 18 farklı fenol türünün tespit edilebilmesi için kullanılmıştır. Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotunun kaplama sırasındaki elektropolimerizasyonuna ait dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 5.56’de verilmiştir.



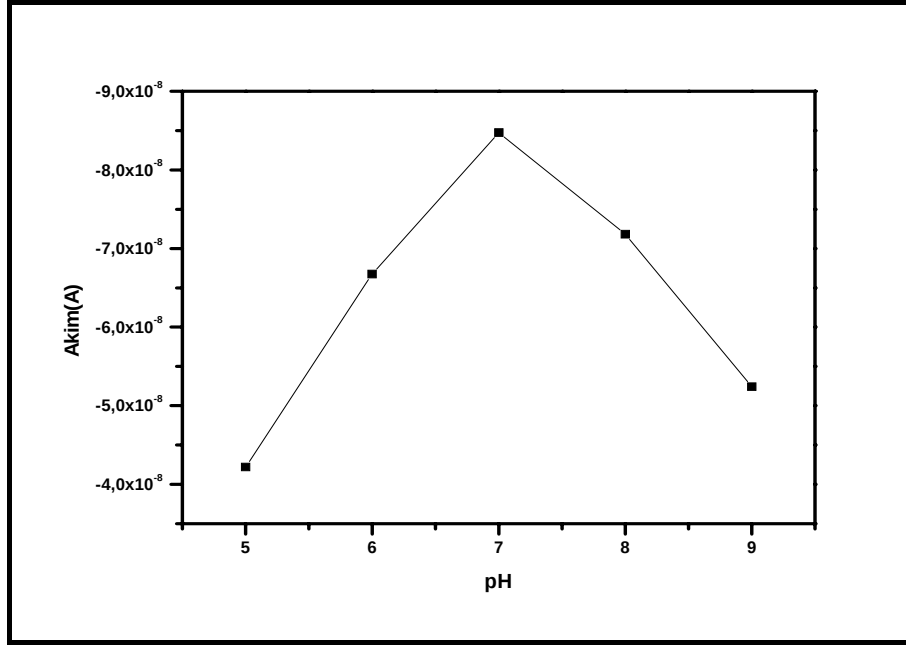
Şekil.5.56 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotu dönüşümlü voltametri eğrisi

Hazırlanan çalışma elektrotu için optimum potansiyel ve optimum pH çalışmaları yapılmıştır. Farklı çalışma potansiyellerinde Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotunun 200µM konsantrasyonuna sahip hidrokinon eklemelerine vermiş olduğu tepki Şekil 5.57’de gösterilmiştir. Buna göre hazırlanan elektrot da en yüksek akım değeri +100mV’da elde edilmiş olup optimum potansiyel olarak bundan sonraki çalışmalarda bu değer kullanılmıştır.



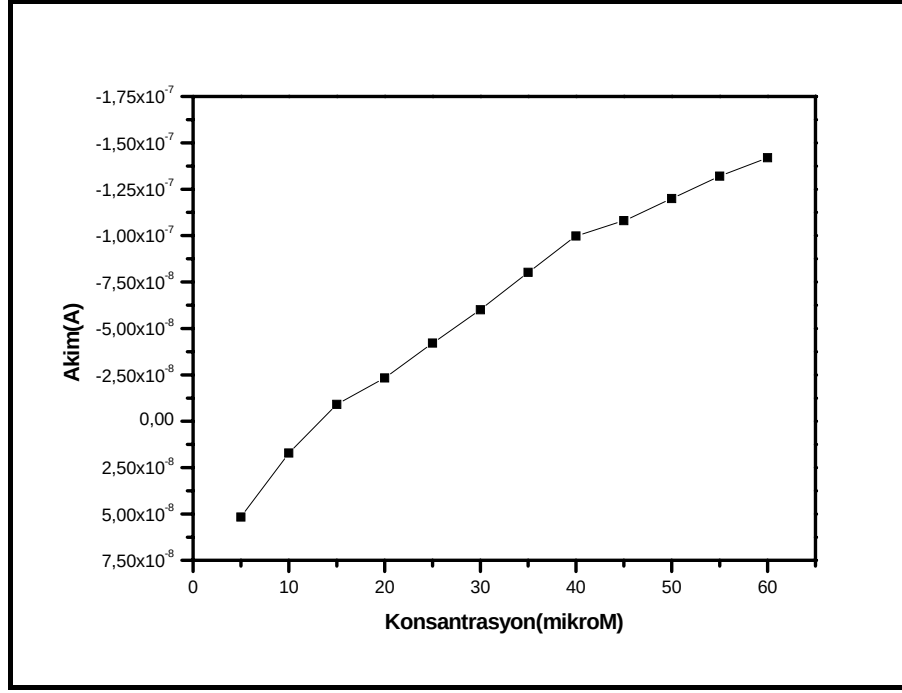
Şekil 5.57 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi (pH=7,0)

200 μ M konsantrasyonuna sahip olan hidrokinon çözeltisi optimum pH'nın tespiti için de kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda hazırlanan çalışma elektrotu için en uygun pH değeri 7,0 olarak bulunmuştur (Şekil 5.58). Diğer fenol bileşikleri için aynı şartlarda yapılan denemelerde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle çalışma elektrotu ile yapılan diğer tüm deneylerde bu şartlar kullanılmıştır.

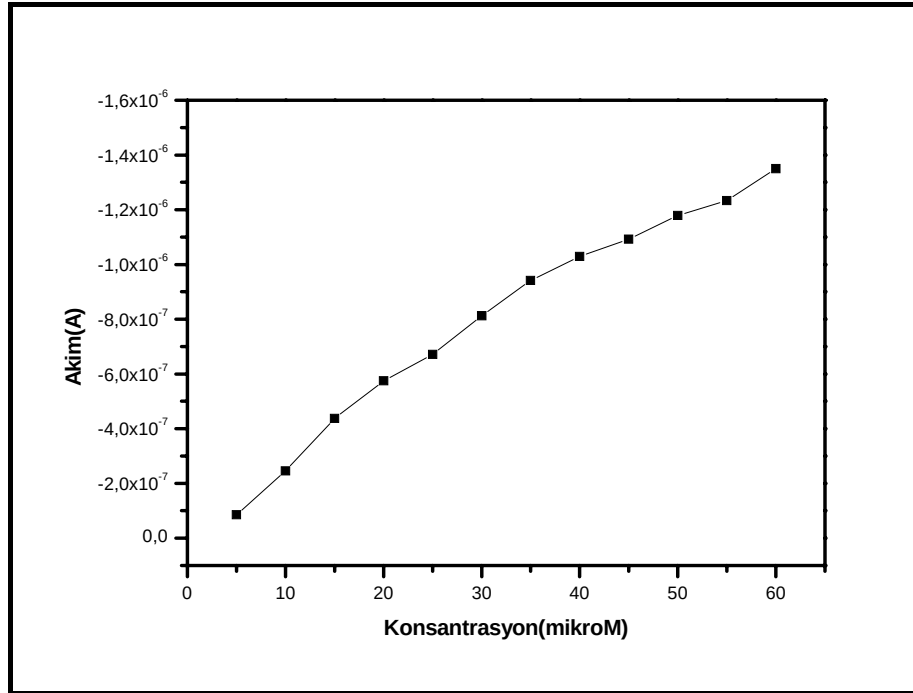


Şekil 5.58 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun optimum pH'sının belirlenmesi ($V=+100$ mV, $pH=7,0$)

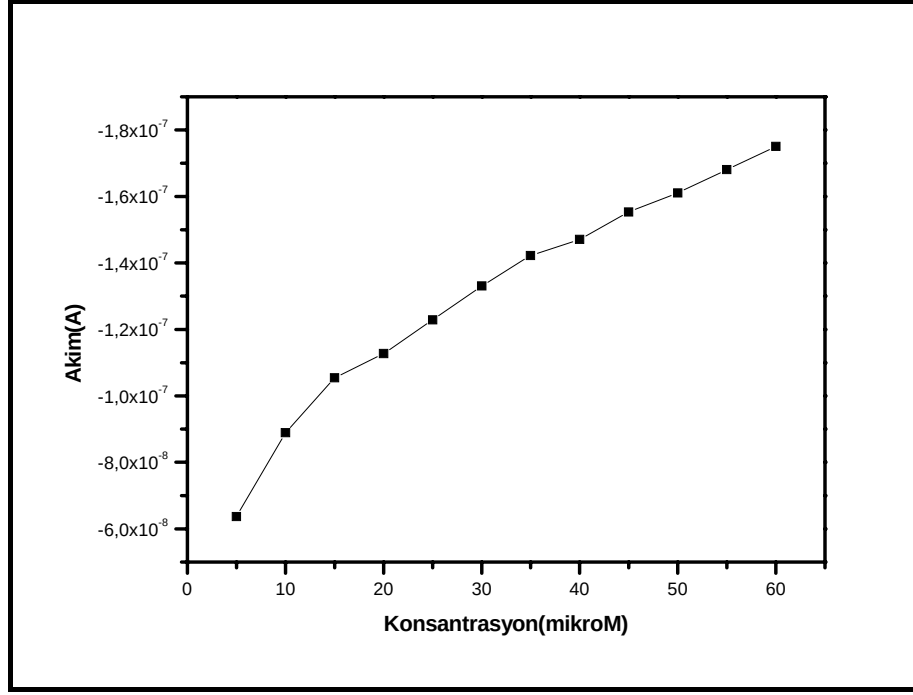
Kesikli ortamda, 600 rpm'lik karıştırma altında, +100 mV'luk (vs. Ag/AgCl) çalışma potansiyelinde her bir fenol bileşiği için 5 μ M konsantrasyondan başlamak üzere düzenli olarak artan konsantrasyonlarda reaksiyon ortamına eklemeler yapılmış ve akım değişimleri gözlenmiştir. Bu denemelere ait akım zaman değişimleri ve kalibrasyon eğrileri Şekil 5.59, Şekil 5.60, Şekil 5.61, Şekil 5.62, Şekil 5.63(a,b) ve Şekil 5.64'de verilmiştir.



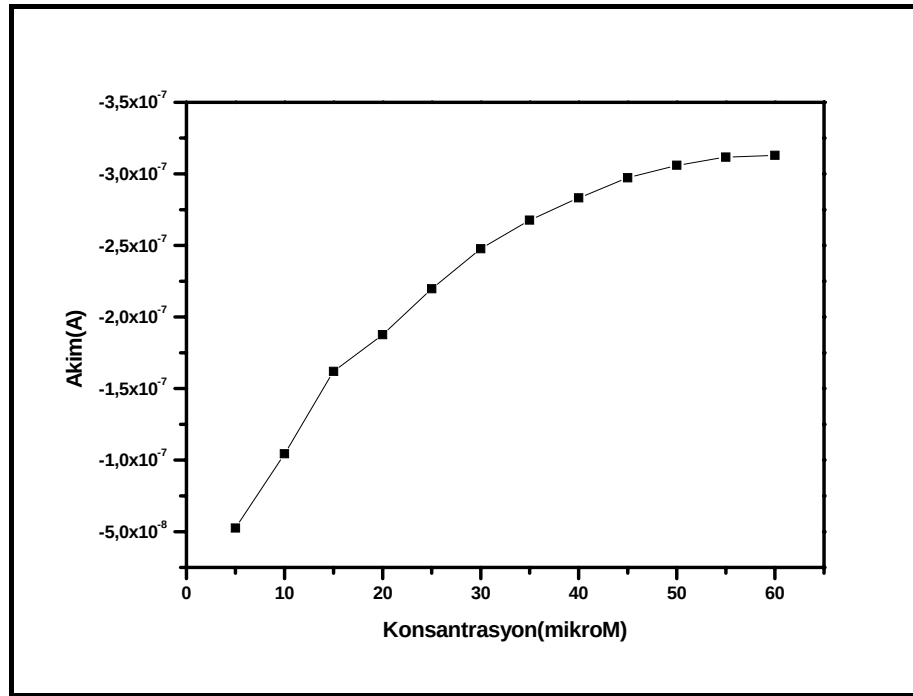
Şekil 5.59 4-aminofenol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV)



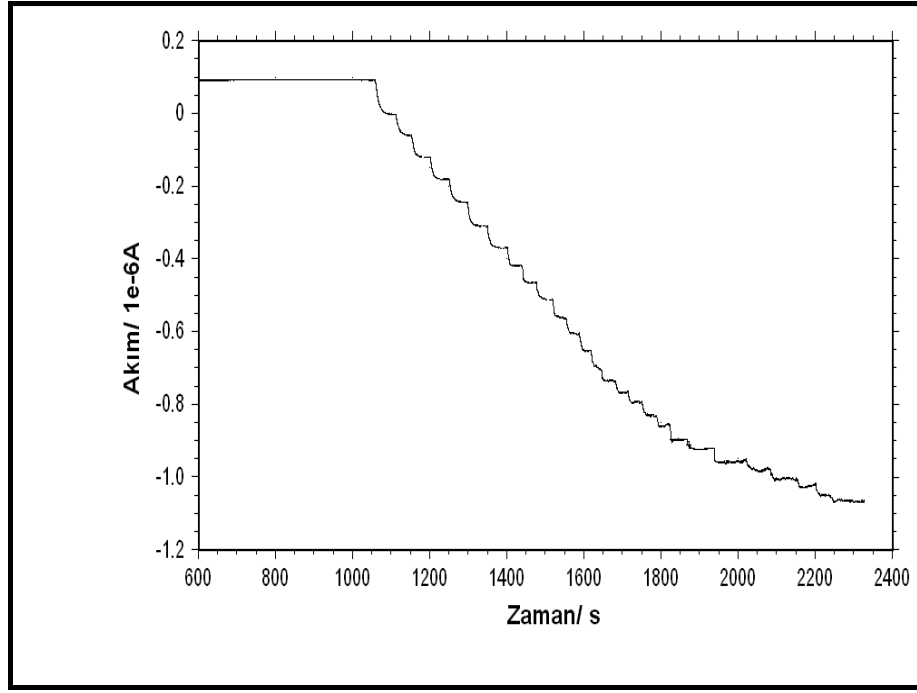
Şekil 5.60 Hidrokinon için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV)



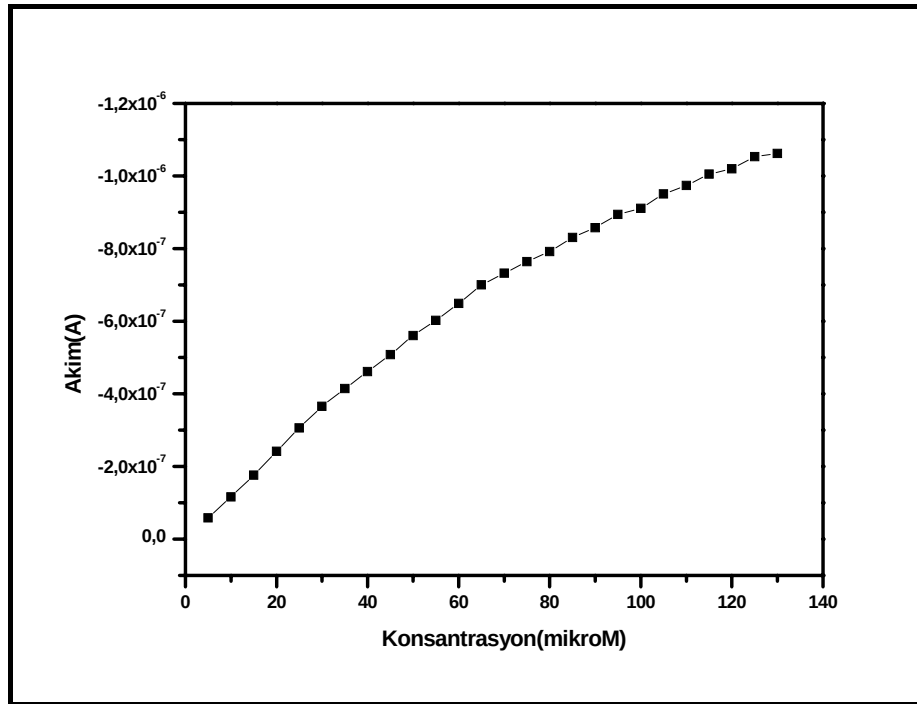
Şekil 5.61 Katekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV)



Şekil 5.62 Pyrogallol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV)

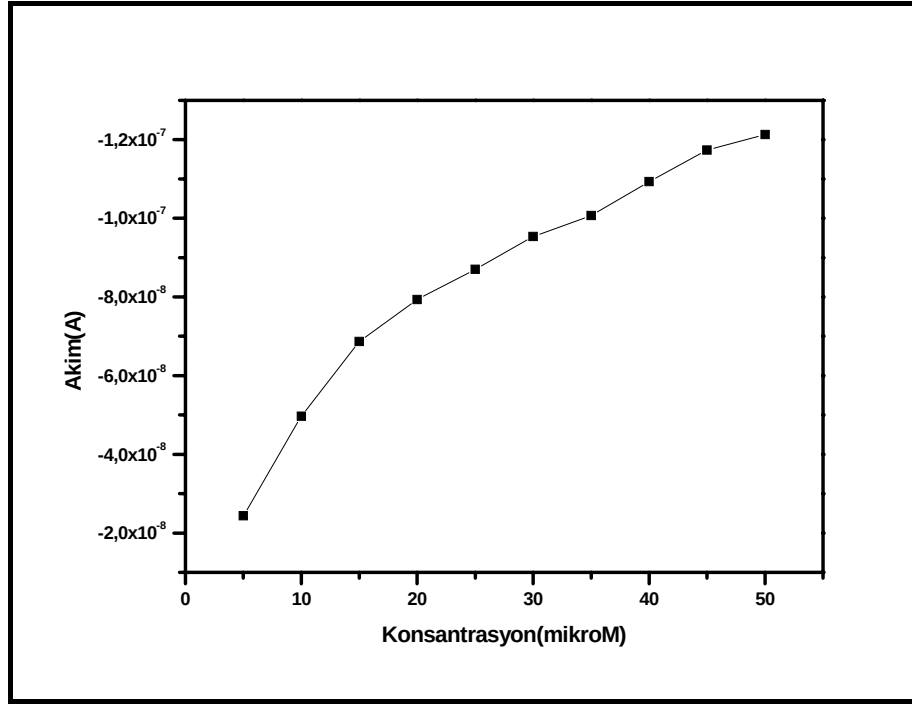


(a)



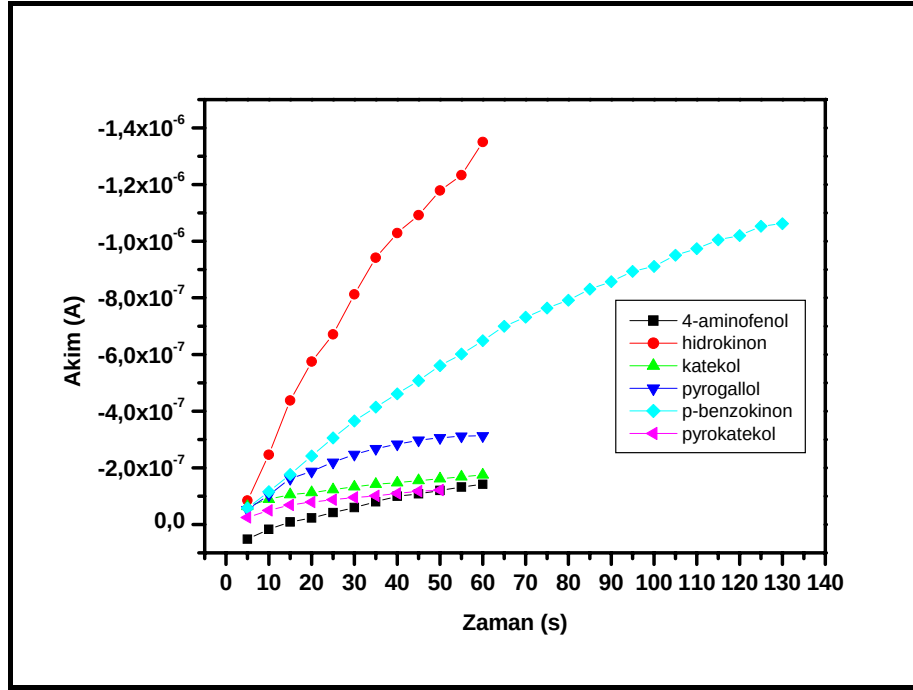
(b)

Şekil 5.63 p-benzokinin için(a) akım-zaman grafiği, (b) kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV)



Şekil 5.64 Pyrokatekol için kalibrasyon eğrisi (pH=7,0; V=+100 mV)

Hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmış analitik parametreler Çizelge 5.7’de verilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin kıyaslaması ise Şekil 5.65’de verilmiştir. Hazırlanan çalışma elektrodunun, 18 fenol bileşiği içinden, pyrokatekol, p-benzokinon, pyrogallol, 4-aminofenol, katekol ve hidrokinon bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir.. Pyrokatekol, p-benzokinon, pyrogallol, 4-aminofenol, katekol ve hidrokinon bileşikleri için elektrodun cevap süreleri sırasıyla; 7, 75, 16, 8, 6 ve 8 s olarak bulunmuştur. Literatürde iletken polimerlerle hazırlanan çeşitli çalışma elektrotlar için 30 s’den daha fazla bir cevap süresi elde edilmiştir (Rajesh v.d.,2005). Li ve arkadaşları (2006) hazırlamış oldukları ZnO/chitosan/Tyr elektrotu ile katekol için cevap süresini 10 s olarak bulmuşlardır. Buradan, Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC elektrotun cevap süresinin oldukça kısa olduğu görülmektedir.



Şekil 5.65 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun farklı fenol bileşikleri için kalibrasyonlarının karşılaştırılması (pH=7,0; V=+100mV)

Çizelge 5.4'deki değerler incelendiğinde hazırlanan biyosensöre tepki veren fenol bileşikleri arasında, katekol ve pyrokatekolün en düşük hassasiyete, hidrokinon'un ise en iyi hassasiyet değerine sahip olduğu açıkça görülmektedir. Belirleme limiti (0,2902 μM) ve relatif standart sapma (%2,722) bakımından katekolün en düşük değere sahip olduğu gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli fenol bileşikleri için hassasiyet değerleri 0,5-76,404 $\mu\text{A}/\text{mM}$ olarak verilmiştir (Rajesh vd., 2004; Zhau vd., 2006; Zejli vd., 2008; Metzker vd., 1998; Heras vd., 2005). Bölüm 4.3.3.4'de yapıları verilmiş olan Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr-karbodiimid/GC elektrot ile analitik parametreleri bakımından yapılan karşılaştırmada, çalışılan biyosensörün aynı fenol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Çizelge 5.4 ve Çizelge 5.7 incelendiğinde Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC biyosensörünün hassasiyeti diğer elektrotta göre daha düşük bulunmuştur. Belirleme limitleri ve relatif standart sapma değerleride bu çalışma elektrotunda daha yüksektir. Ayrıca yapılan düzenli ölçümlerde 60 gün sonunda biyosensörün aktivitesini % 65 oranında kaybettiği gözlenmiştir. Yine Bölüm 4.3.3.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan ,enzimin karbodiimid kullanılarak çapraz olarak bağlandığı, çalışma elektrotu ile kıyaslandığında Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC elektrotun aktivite kaybının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Elektrotlar arasındaki bu farklılıkların enzim tutkama yöntemlerinin farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir.

Çizelge 5.7 Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotu analitik parametreleri

<i>Fenolik Tür</i>	<i>R²</i>	<i>Hassasiyet (nA/μM)</i>	<i>Lineer aralık (μM)</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>Std. Sapma (nA)</i>	<i>%RSD</i>
fenol	<i>Tepki yok</i>					
p-benzokinon	0,99	8	10-130	0,9526	±2,540	7,568
hidrokinon	0,98	10	10-60	0,9526	±6,35	4,669
2,6 dimetoksifenol	<i>Tepki yok</i>					
2-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
3-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-klorofenol	<i>Tepki yok</i>					
2-aminofenol	<i>Tepki yok</i>					
4-aminofenol	0,99	3	15-60	0,790	±0,790	4,050
pyrokatekol	0,99	2	15-50	0,6469	±0,4312	5,282
guaiakol	<i>Tepki yok</i>					
m-kresol	<i>Tepki yok</i>					
o-kresol	<i>Tepki yok</i>					
p-kresol	<i>Tepki yok</i>					
katekol	0,99	2	10-60	0,2902	±0,1935	2,722
4-asetamidofenol	<i>Tepki yok</i>					
pyrogallol	0,98	5	15-45	2,45	±4,091	16,7
4-metoksifenol	<i>Tepki yok</i>					

5.5 Çalışılan Fenolik Türlerin Gaz Kromatografında (GC-MS) Ölçümleri

Proje kapsamında 18 fenolik tür farklı tipte hazırlanmış çalışma elektrotlarından oluşan biyosensörde test edilmiş, ölçüm metotları sağlıklı bir şekilde oluşturulmuştur. Söz konusu fenolikler ölçüm metotlarını karşılaştırma amacıyla bir de gaz kromatografı cihazında ölçülmüştür. Ölçüm metodu aşağıdaki şekilde kurulmuştur:

Kolon adı: DB-5 MS kolonu

Kolon model numarası: Agilent 19091S-433 HP-5MS (Capillary 30 m × 250 µm × 0.25 µm nominal)

Taşıyıcı gaz: Helyum

İnlet sıcaklığı: 280°C

İnlet modu: Pulsed splitless

Kolon akışı: 1.2 mL/dak

Fırın sıcaklığı: 40°C'da 2 dakika bekleme, 10°C/dak. ile 100°C'ye çıkma, 2°C/dak. ile 105°C'ye çıkma, 10°C/dak. ile 250°C'ye çıkma şeklinde programlanır.

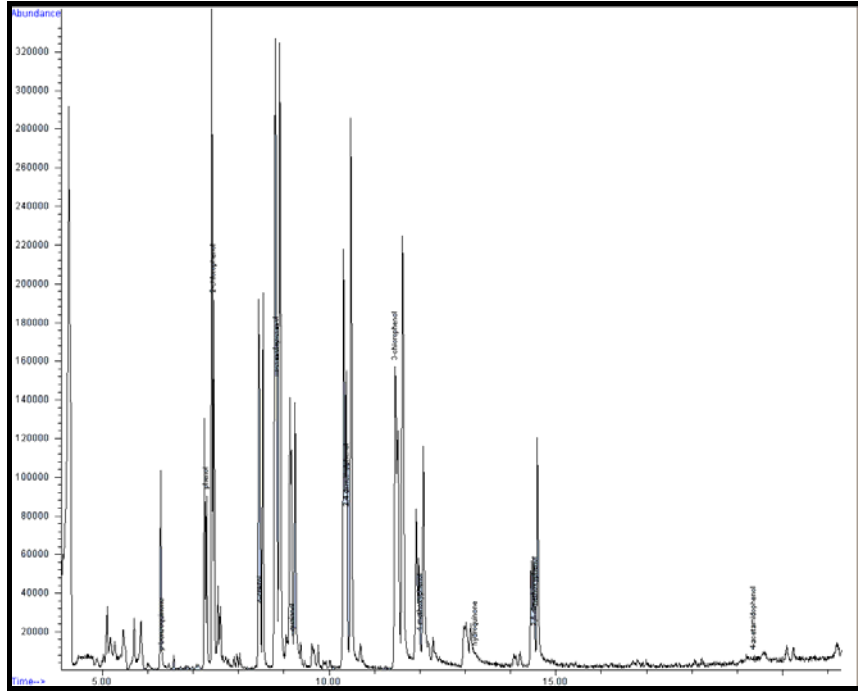
Aux sıcaklığı: 280 °C

MS Quad: 150 °C

MS Source: 230 °C

Ölçüm süresi: 29.7 dakika

Ölçüm için 18 fenol bileşimini bir arada içeren bir stok hazırlanmıştır. Bu stok fenol çözeltisi her bir fenoliğin konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde saf metanolde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stoktan sırasıyla konsantrasyonu 1.5-3-6.25-13-25-50-100 ve 200 µM olacak şekilde 8 adet standart fenolik çözelti hazırlanmıştır. GC-MS cihazının programı yukarıdaki gibi ayarlanmış ve bu 8 standart fenolik çözelti cihaza verilmiştir. Cihaz, her bir fenoliğin konsantrasyonuna karşı oluşan pik alanlarını otomatik olarak hesaplamıştır. Fenolik konsantrasyonuna karşı hesaplanan bu alanlar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. GC-MS ölçüm metodu sonuçları Çizelge 5.8'de verilmiştir. GC-MS fenolik ölçümüne ait kromatogram görüntüsü Şekil 5.66'da verilmiştir.



Şekil 5.66 Fenolik türlere ait GC-MS kromatogram görüntüsü

GC-MS ölçüm metodu ile biyosensör ölçüm metodu kıyaslandığında, GC-MS ölçüm metodunda hesaplanan LOD değerleri oldukça yüksek çıkmıştır. Söz konusu biyosensörlerde ise LOD değerleri oldukça düşüktür. Yani biyosensörde söz konusu fenolik türler için GC-MS metoduna göre daha düşük konsantrasyonlar belirlenebilmektedir. GC-MS ölçüm metodunda hesaplanan geri kazanım değerleri sağlıklı çıkmamıştır. Yani hazırlanan fenol konsantrasyonu ile cihazda okunan konsantrasyon arasındaki fark biyosensöre göre açıktır. GC-MS ölçüm metodunda aynı konsantrasyonda fenoliğin ard arda cihaza verilmesi sonucu oluşan pik alanlarının standart sapma değerleri L çalışma elektroduna göre oldukça yüksek çıkmıştır. Bu da ölçüm stabilitesinin iyi olmadığı sonucunu vermektedir. GC-MS ölçüm metodunda, lineer okuma aralığı p-benzokinin, 4-klorofenol ve 4-asetamidofenol için oldukça küçüktür. GC-MS ölçüm metodunda m-kresol ve p-kresol aynı yerde pik oluşturdıklarından beraber ölçülmüştür. Ayrıca GC-MS ölçüm metodu ile test edilen her fenolik tür için yüksek konsantrasyonlarda ölçüm yapabilmek mümkün değildir. Çünkü aşırı yüklemeler kolona ve kolon içi dolgu malzemesine zarar vermektedir. GC-MS ölçüm metodunda kullanılan fenol stokları metanolde yani bir solventte hazırlanmıştır. Sulu fazda ölçüm yapabilmek ancak cihaza numune vermeden önce numuneyi ekstrakte etmekle mümkün olabilmekte, bu da ölçümden önce kayıplara yol açabilmektedir. GC-MS ölçüm metodu ile ölçüm süresi yaklaşık 30 dakika iken, biyosensörde bu süre 2 saniyedir.

Çizelge 5.8 GC-MS Ölçüm metoduyla elde edilen analitik parametreler

<i>Fenolik tür</i>	<i>r</i>	<i>Lineer aralık (μM)</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>%Geri kazanım</i>	<i>% RSD</i>
<i>Fenol</i>	0.997	1.56-200	1.37	94	4.85
<i>p-benzokinon</i>	0.999	1.56-25	1.49	113.5	4.39
<i>Hidrokinon</i>	0.999	1.56-200	1.40	96.6	4.84
<i>2,6-dimetoksifenol</i>	0.997	6.25-200	2.45	79.2	10.33
<i>2-klorofenol</i>	0.997	1.56-200	1.51	96.6	5.23
<i>3-klorofenol</i>	0.987	1.56-100	1.48	75.3	6.57
<i>4-klorofenol</i>	0.994	1.56-50	1.10	89.8	4.08
<i>2-aminofenol</i>	tepki yok				
<i>4-metoksifenol</i>	0.998	1.56-200	1.5	87.9	5.7
<i>Pyrokatekol</i>	tepki yok				
<i>Guaiakol</i>	0.998	1.56-200	1.53	100.5	5.09
<i>m-kresol + p-kresol</i>	0.995	1.56-200	1.39	107.6	4.33
<i>o-kresol</i>	0.997	1.56-200	1.54	96.9	5.3
<i>Katekol</i>	tepki yok				
<i>4-asetamidofenol</i>	0.966	1.56-12.5	1.5	66.3	7.54
<i>Pyrogallol</i>	tepki yok				
<i>2,4-dimetilfenol</i>	0.997	1.56-200	1.25	100.8	4.14

6. SONUÇLAR

1- Sürekli sistemde hazırlanan PPy/CNT/Tyr ve Ppy/Tyr elektrotlarıyla katekol ölçümleri yapılmıştır. Belirleme limiti (LOD) değerleri, sırasıyla 0,671 μ M ve 1,440 μ M olarak bulunmuştur. Katekol için, PPy/CNT/Tyr elektrotunun hassasiyeti 8nA/ μ M olup, Ppy/Tyr elektrotundan (0,9 nA/ μ M) daha yüksek bir değere sahiptir. Sürekli sistem denemeleri ile kesikli sistemde yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında bu sistemde daha düşük hassasiyet değerleri elde edildiği görülmektedir. Belirleme limitleri kesikli sistem elektrotlarıyla karşılaştırıldığında uygun aralıklarda olduğu görülmüştür. Sürekli sistemde hazırlanan elektrotlar geniş bir lineer aralığa sahiptir.

2- Kesikli sistemde karbodiimid bağlama metoduyla hazırlanan çalışma elektrotunda; PPy/CNT/Tyr/GC elektrotunun kaplama esnasındaki dönüşümlü voltametri grafiğine göre; akım değerleri, PPy/Tyr/GC elektrotunkine göre oldukça yüksek bulunmuştur. Bu durum elektrot hazırlanmasında CNT'nin ortama ilavesiyle ilişkilidir. Hazırlanan çalışma elektrotunun pyrokatekol, katekol, p-kresol, 4-metoksifenol ve 4-asetamidfenol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Biyosensör uygun hassasiyet değeri, düşük belirleme limiti, geniş lineer aralık, hızlı cevap süresi ve güvenilir aralıkta ölçüm stabilitesi göstermiştir. 4-asetamidfenol bileşiği oldukça düşük bir belirleme limitine sahiptir. Belirleme limitleri bakımından 4-asetamidfenol<pyrokatekol<4-metoksifenol<p-kresol<katekol şeklinde bir sıralama mevcuttur. Relatif standart sapma değerleri ise %0,914-%11,2 aralığında değişmektedir. Yapılan düzenli ölçümlerde 40 gün sonunda biyosensörün aktivitesini %55 oranında kaybettiği gözlenmiştir.

Ppy/Tyr çalışma elektrotunun p-benzokinon, hidrokinon, pyrokatekol, katekol ve pyrogallol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Tablodan da anlaşılabileceği gibi pyrogallol bileşiği diğer fenol bileşiklerine göre daha yüksek bir hassasiyet değerine sahiptir. Biyosensörün tepki verdiği fenol bileşikleri için hassasiyet sıralaması pyrogallol> p-benzokinon> pyrokatekol > hidrokinon=katekol şeklindedir. Fenol bileşikleri arasındaki hassasiyetin farklı olması, matriksin hidrofobik özelliklerinden dolayı , tutuklanan matrikste her bir fenol bileşiğinin çözünülebilirliğine ve moleküler engellemeye bağlı olduğu tespit edilmiştir. p-benzokinon, hidrokinon, pyrokatekol, katekol ve pyrogallol bileşikleri için belirleme limitleri sırasıyla 0,743; 0,2425; 1,132; 0,4472 ve 0,4115 μ M olarak bulunmuştur. Belirleme limitleri bakımından en düşük değer görüldüğü gibi hidrokinon bileşiğine aittir. İki elektrot arasında yapılan kıyaslamada; pyrokatekol ve katekol bileşiklerinde hesaplanan analitik parametreler bakımından Ppy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotunun daha verimli olduğu bulunmuştur.

Belirleme limitleri, hassasiyet ve relatif standart sapma bakımından CNT modifiye edilmiş elektrot daha iyi bir performans göstermiştir.

3-Karbodiimid bağlama metoduyla enzimin bağlandığı, Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrodunun, 18 fenol bileşiği içinden, pyrokatekol, p-benzokinon, pyrogallol, 4-aminofenol, katekol ve hidrokinon bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Pyrokatekol, p-benzokinon, pyrogallol, 4-aminofenol, katekol ve hidrokinon bileşikleri için elektrodun cevap süreleri sırasıyla; 5, 50, 12, 6, 4 ve 6 s olarak bulunmuştur. Biyosensöre tepki veren fenol bileşikleri arasında, katekolün en düşük hassasiyete, 4-aminofenol'ün ise en iyi hassasiyet değerine sahip olduğu açıkça görülmektedir. Ayrıca 4-aminofenol bileşiğinin oldukça düşük belirleme limitine (0,0976 μM) ve relatif standart sapma değerine (%1,532) sahip olduğu gözlenmiştir. Hassasiyet değerlerine bakıldığında 4-aminofenolün en yüksek hassasiyete sahip olduğu görülmektedir. 4-aminofenol, hidrokinon, p-benzokinon, katekol, pyrokatekol ve pyrogallol için bulunan hassasiyet değerleri sırasıyla 50, 10, 9, 8, 10 ve 10 nA/ μM şeklindedir. Yapılan düzenli ölçümlerde 60 gün sonunda biyosensörün aktivitesini % 43 oranında kaybettiği gözlenmiştir.

Hazırlanan Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC elektrotun 4-aminofenol, hidrokinon, katekol, p-benzokinon ve pyrogallol bileşiklerine yanıt verdiği gözlenmiştir. Yapılan hesaplamalarda bu çalışma elektrotu için, hidrokinonun en yüksek hassasiyet değerine (20 nA/ μM) sahip olduğu bulunmuştur. Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/CNT/GC elektrot ile aynı fenol bileşiklerine tepki verdiği görülmüştür. Hidrokinon bileşiğinin hassasiyeti Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/CNT/GC elektrotta 50 nA/ μM iken Poly(GMA-co-MTM)/PPy/Tyr/GC elektrotta ise 20 nA/ μM olarak bulunmuştur. Genel olarak diğer fenol bileşiklerinin de karşılaştırılması yapılırsa hassasiyet, belirleme limiti ve relatif standart sapma gibi parametreler bakımından CNT ile hazırlanan elektrotun değerlerinin diğerine göre daha iyi olduğu görülebilir. Yapılan düzenli ölçümlerde 40 gün sonunda biyosensör aktivitesinin %42'sini, 60 gün sonunda ise %68'ini kaybettiği gözlenmiştir.

4- Enzimin elektropolimerizasyonla bağlamasıyla Ppy/CNT/Tyr/GC çalışma elektrotu hazırlanmıştır. Çalışma elektrotunun hidrokinon, pyrokatekol, katekol, pyrogallol ve 4-aminofenol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. 4-aminofenol bileşiği diğer fenol bileşiklerine göre daha yüksek bir hassasiyet değerine sahiptir. Ancak genel olarak diğer enzim tutuklama yöntemiyle hazırlanan elektrotlarla kıyaslandığında hassasiyet değerlerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Hidrokinon, pyrokatekol, katekol, pyrogallol ve 4-aminofenol bileşikleri için belirleme limitleri sırasıyla 0,551, 1,952, 1,228, 0,03636 ve 1 μM

olarak bulunmuştur. Belirleme limitleri bakımından en düşük değer görüldüğü gibi pyrogallol bileşiğine aittir. Relatif standart sapma (RSD) değerleri ise %2,928 ile %9,809 arasında değişmektedir. Ayrıca elektrotun oldukça geniş bir lineer aralığa sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hazırlanan çalışma elektrotunun, Bölüm 5.3.1’de çalışma bulguları verilen ve karbodiimid kullanılarak enzim tutuklanması sağlanan, Ppy/CNT/Tyr/GC elektrot ile direk enzim tutuklanması yöntemiyle hazırlanan Ppy/CNT/Tyr/GC elektrotun ortak tepki verdiği fenol bileşiklerinin pyrokatekol ve katekol olduğu saptanmıştır. Buradan fenol bileşikleri için hazırlanan elektrotların bir seçiciliğe sahip olduğu sonucuna varılabilir. Elektrotlar arasında kıyaslama yapılarak direk enzim tutuklamasıyla hazırlanan Ppy/CNT/Tyr/GC elektrotun hesaplanan analitik değerleri diğer elektrota göre daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

5- Elektropolimerizasyon ile hazırlanan çalışma elektrodunun (Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC) , 18 fenol bileşiği içinden, pyrokatekol, p-benzokinon, pyrogallol, 4-aminofenol, katekol ve hidrokinon bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Pyrokatekol, p-benzokinon, pyrogallol, 4-aminofenol, katekol ve hidrokinon bileşikleri için elektrodun cevap süreleri sırasıyla; 7, 75, 16, 8, 6 ve 8 s olarak bulunmuştur. hazırlanan biyosensöre tepki veren fenol bileşikleri arasında, katekol ve pyrokatekolün en düşük hassasiyete, hidrokinon’un ise en iyi hassasiyet değerine sahip olduğu açıkça görülmektedir. Belirleme limiti (0,2902 μ M) ve relatif standart sapma (%2,722) bakımından katekolün en düşük değere sahip olduğu gözlenmiştir. Bölüm 4.3.3.4’de yapılışı verilmiş olan Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr-karbodiimid/GC elektrot ile analitik parametreleri bakımından yapılan karşılaştırmada, çalışılan biyosensörün aynı fenol bileşiklerine tepki verdiği saptanmıştır. Çizelge 5.4 ve Çizelge 5.7 incelendiğinde Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC biyosensörünün hassasiyeti diğer elektrota göre daha düşük bulunmuştur. Belirleme limitleri ve relatif standart sapma değerleride bu çalışma elektrotunda daha yüksektir. Ayrıca yapılan düzenli ölçümlerde 60 gün sonunda biyosensörün aktivitesini % 65 oranında kaybettiği gözlenmiştir. Yine Bölüm 4.3.3.4’de anlatıldığı şekilde hazırlanan ,enzimin karbodiimid kullanılarak çapraz olarak bağlandığı, çalışma elektrotu ile kıyaslandığında Poly(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/Tyr/GC elektrotun aktivite kaybının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Elektrotlar arasındaki bu farklılıkların enzim tutuklama yöntemlerinin farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir.

6- Söz konusu fenolikler ölçüm metotlarını karşılaştırma amacıyla bir de gaz kromatografi cihazında ölçülmüştür. GC-MS ölçüm metodu ile biyosensör ölçüm metodu kıyaslandığında, GC-MS ölçüm metodunda hesaplanan LOD değerleri oldukça yüksek çıkmıştır. Söz konusu biyosensörlerde ise LOD değerleri oldukça düşüktür. Yani biyosensörde söz konusu fenolik

türler için GC-MS metoduna göre daha düşük konsantrasyonlar belirlenebilmektedir. GC-MS ölçüm metodunda hesaplanan geri kazanım değerleri sağlıklı çıkmamıştır. Yani hazırlanan fenol konsantrasyonu ile cihazda okunan konsantrasyon arasındaki fark biyosensöre göre açıktır. GC-MS ölçüm metodunda aynı konsantrasyonda fenoliğin ard arda cihaza verilmesi sonucu oluşan pik alanlarının standart sapma değerleri çalışma elektroduna göre oldukça yüksek çıkmıştır. Bu da ölçüm stabilitesinin iyi olmadığı sonucunu vermektedir. GC-MS ölçüm metodunda, lineer okuma aralığı p-benzokinon, 4-klorofenol ve 4-asetamidofenol için oldukça küçüktür. GC-MS ölçüm metodunda m-kresol ve p-kresol aynı yerde pik oluşturdıklarından beraber ölçülmüştür. Ayrıca GC-MS ölçüm metodu ile test edilen her fenolik tür için yüksek konsantrasyonlarda ölçüm yapabilmek mümkün değildir. Çünkü aşırı yüklemeler kolona ve kolon içi dolgu malzemesine zarar vermektedir. GC-MS ölçüm metodunda kullanılan fenol stokları metanolde yani bir solventte hazırlanmıştır. Sulu fazda ölçüm yapabilmek ancak cihaza numune vermeden önce numuneyi ekstrakte etmekle mümkün olabilmekte, bu da ölçümden önce kayıplara yol açabilmektedir. GC-MS ölçüm metodu ile ölçüm süresi yaklaşık 30 dakika iken, biyosensörde bu süre 2 saniyedir.

KAYNAKLAR

- Abu-Rabeah, K., Polyak, B., Ionescu, R.E., Cosnier, S. ve Marks, R.S., (2005), "Synthesis and characterization of a pyrrole–alginate conjugate and its application in a biosensor construction", *Biomacromolecules*, 6:3313-3318.
- Agüi, L., Yanez-Sadeno ve Pingarron, J.M., (2008), "Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry", *Anal. Chim. Acta*, 622: 11-47.
- Alkan, S., Toppare, L., Yagci, Y. ve Hepuzer, Y., (1999), "Immobilization of invertase in conducting thiophenecapped poly(methyl methacrylate)/polypyrrole matrices, *J. Biomater. Sci.*, 10:1223-1235.
- Andreescu, S. ve Sadık O.A., (2005), "Advanced electrochemical sensors for cell cancer monitoring", *Methods* 37:84–93.
- Besombes, J.L., Cosnier, S., Labbe, P. ve Reverdy G., (1995), "Determination of phenol and chlorinated phenolic compounds based on a PPO-bioelectrode and its inhibition", *Anal. Lett.*, 28:405-424.
- Campuzano, S., Serra, B., Pedrero, M., Villena, F. ve Pingarron J. M.,(2003), "Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds at self-assembled monolayer-based tyrosinase biosensors", *Anal. Chim. Acta*, 494:187–197.
- Castillo, J., Gaspar, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Sooukharev, V., Dorneanu, S.A., Ryabov, A.D. ve Csöregi, E., (2004), "Biosensors for life quality Design, development and applications", *Sensors and Act. B.*, 102:179-194.
- Chang, S.C., Rawson, K. ve McNeil C.J., (2002), "Disposable tyrosinase-peroxidase bi-enzyme sensor for amperometric detection of phenols", *Biosens. Bioelectron.*, 17:1015-1023.
- Cockerman, L.G. ve Shane, B.S., (1994), *Basic Environmental Toxicology*, CRC Press/Lewis Publishers, New York.
- Cristea, C., Mousty, C., Cosnier, S. ve Popescu I. C., (2005), "Organic phase PPO biosensor based on hydrophilic films of electropolymerized polypyrrole", *Electrochim. Acta*, 50:3713-3718.
- Dantoni, P., Serrano, S.H.P., Oliveira Brett, A.M. ve Gutz I.G.R., (1998), "Flow-injection determination of catechol with a new tyrosinase/DNA biosensor", *Anal. Chim. Acta*, 366:137-145.
- Dempsey, E., Diamond, D. ve Collier, A., (2004), "Development of a biosensor for endocrine disrupting compounds based on tyrosinase entrapped within a poly(thionine) film", *Biosens. Bioelectron.*, 20:367–377.
- Dinçkaya, E., Çağın, M. ve Telefoncu, A., (1994), "Enzymatic method for the spectrophotometric determination of aspartame", *Food Chemistry*, 50:95-97.
- El Kaoutit, M., Naranjo-Rodriguez, I., Temsamani, K.R. ve Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L., (2007), "The Sonogel–Carbon materials as basis for development of enzyme biosensors for phenols and polyphenols monitoring: A detailed comparative study of three immobilization matrixes", *Biosens. Bioelectron.*, 22:2958-2966.
- Freire, R.S., Duran, N. ve Kubota L.T., (2002), "Development of a laccase-based flow injection electrochemical biosensor for the determination of phenolic compounds and its

application for monitoring remediation of Kraft E1 paper mill effluent”, *Anal. Chim. Acta*, 463:229-238.

Gerard, M., Chaubey, A. ve Malhotra, B.D., (2002), “Application of conducting polymers to biosensors”, *Biosens. and Bioelect.*, 17:345-359.

Geetha, S., Rao, C.R.K., Vijayan, M. ve Trivedi, D.C., (2006), “Biosensing and drug delivery by polypyrrole”, *Analytica Chimica Acta* 568:119–125.

Greene, R.L., Street, G.B. ve Suter L.J., (1975), “Superconductivity in polysulfur nitride (SN)_x”, *Phys. Rev. Lett.*, 34:577-579.

Hansen, E.H., (1996), “Principles and applications of flow injection analysis in biosensors”, *J of Molec. Recogn.*, 9:316-325.

Hara, M., Yasuda, Y., Toyotama, H., Ohkawa, H., Nozawa, T. ve Miyake, J., (2002), “A novel ISFET-type biosensor based on P450 monooxygenases”, *Biosensors and Bioelectronics*, 17:173-179.

Hasebe K., Osteryoung J., (1975), “Differential pulse polarographic determination of some carcinogenic nitrosamines”, *Anal. Chem.*, 47:2412-2418.

Heras, M.A., Lupu, S., Pigani, L., Pirvu, C., Seeber, R., Terzi, F. ve Zanardi, C., (2005), “A poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrene sulphonate) composite electrode coating in the electrooxidation of phenol”, *Electrochimica Acta*, 50:1685-1691.

Himuro, Y., Takai, M. ve Ishihara, K., (2009), “Poly(vinylferrocene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) mediator as immobilized enzyme membrane for the fabrication of amperometric glucose sensor”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136, 122-127

Iijima, S., (1991), “Helical microtubules of graphite carbon”, *Nature*, 354:56-58.

Kim M.A. ve Lee W.Y., (2003), “Amperometric phenol biosensor based on sol–gel silicate/Nafion composite film”, *Anal. Chim. Acta*, 479:143-150.

Korkut, S., Keskinler, B. Ve Erhan, E., (2008), “An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotubepoly (pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives”, *Talanta*, 76:1147-1152.

Li, Y.F., Liu, Z.M., Liu, Y.L., Yang, Y.H., Shen, G.L. ve Yu R.Q., (2006), “A mediator-free phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles”, *Anal. Biochem.*, 349:33-40.

Liu, S., Yu, J., Ju, H., (2003), “Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode”, *J of Electroanal. Chem.*, 540:61-67.

Liu, Y., O'Brien, S. C., Zhang, Q., Heath, J. R., Tittel, F. K., Curl, R. F., Kroto, H. W. ve Smalley, R. E., (1986), “Negative carbon cluster ion beams: New evidence for the special nature of C₆₀”, *Chemical Physics Letters*, 126:215-217.

Liu, Z., Liu, J., Shen, G. ve Yu, R., (2006), “A reagentless tyrosinase biosensor based on 1,6-hexanedithiol and nano- Au self-assembled monolayers”, *Electroanalysis*, 18:1572-1577.

Malhotra B.D., Chaubey, A. ve Singh, S.P., (2006), “Prospects of conducting polymers in biosensors”, 578: 59-74.

Metzger, J., Reis, M. ve Hartmeier, W., (1998), “Amperometric phenol biosensor based on a

thermostable phenol hydroxylase”, *Biosens. and Bioelect.*, 13:1077-1082.

Parellada, J., Narvaez, A., Lopez, M.A., Dominguez, E., Fernandez, J.J., Pavlov, V. ve Katakis, I., (1998), “Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications”, *Anal. Chim. Acta*, 362:47-57.

Peromo, J., Hinters, H., Sundermeier, C., Seifert, W., Morell, O.M ve Knoll, M., (2000), “Miniaturized real-time monitoring system for l-lactate and glucose using microfabricated multi-enzyme sensor”, *Biosens. Bioelectron.*, 15: 515-522.

Portaccio, M., Di Martino, S., Maiuri, P., Durante, D., De Luca, P., Lepore, M., Bencivenga, U., Rossi, S., De Maio, A. ve Mita, D.G., (2006), “Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model”, *Jour. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 41: 97-102.

Rajesh, Ahuja, T. ve Kumar, D., (2009), “Recent progress in the development of nano-structured conducting polymers/nanocomposites for sensor applications”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136:275-286.

Rajesh, Kaneto, K., (2005), “A new tyrosinase biosensor based on covalent immobilization of enzyme on *N*-(3-aminopropyl) pyrrole polymer film”, *Current Appl. Phys.*, 5:178-183.

Rajesh, Takashima, W. ve Kaneto, K., (2004a), “Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase onto an electrochemically prepared novel copolymer poly (*N*-3-aminopropyl pyrrole-copolyrrole) film”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 102:271-277.

Rajesh, Takashima, W. ve Kaneto, K., (2004b), “Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized PTS-doped polypyrrole film as an entrapment support”, *Reactive Func. Polymer*, 59:163-169.

Rijiravanich, P., Aoki, K., Chen, J., Surareungchai, W. ve Somasundrum, M., (2006), “Micro-cylinder biosensors for phenol and catechol based on layer-by-layer immobilization of tyrosinase on latex particles: Theory and experiment”, *J of Electroanal. Chem.*, 589:249-258.

Rinken, T., Rinken, A., Tenno, T. ve Järvi, J., (1998), “Calibration of glucose biosensors by using pre-steady state kinetic data”, *Biosensors and Bioelectronics*, 13:801-807.

Rivas, G.R., Rubianes, M.D., Rodríguez, M.C., Ferreyra, N.F., Luque, G.L., Pedano, M.L., Miscoria, S.A. ve Parrado C., (2007), “Carbon nanotubes for electrochemical biosensing”, *Talanta*, 74, 291-307

Rogers, K.R., Becker, J.Y. ve Cembrano, J., (2000), “Improved selective electrocatalytic oxidation of phenols by tyrosinase-based carbon paste electrode biosensor”, *Electrochim. Acta*, 45:4373–4379.

Salimi, A. ve Hallaj, R., (2005), “Catalytic oxidation of thiols at preheated glassy carbon electrode modified with abrasive immobilization of multiwall carbon nanotubes: applications to amperometric detection of thiocytosine, l-cysteine and glutathione”, *Talanta*, 66: 967-975

Sanz, V.C., Mena, M.L., Gonzalez-Cortes, A., Yanez-Sedeno, P. ve Pingarron, J.M. (2005), “Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines”, *Anal. Chim. Acta.*, 528:1-8.

Serra, B., Benito, B., Agüí, L., Reviejo, A.J. ve Pingarron J.M., (2001), “Graphite-Teflon-Peroxidase composite electrochemical biosensors. A tool for the wide detection of phenolic

compounds”, *Electroanalysis*, 13:693-700.

Serra, B., Jimenez, S., Mena, M.L., Reviejo, A.J. ve Pingarron J.M., (2002), “Composite electrochemical biosensors: a comparison of three different electrode matrices for the construction of amperometric tyrosinase biosensors”, *Biosens. Bioelectron.*, 17:217–226.

Spence, D.M. ve Crouch, S.R., (1997), “Factors affecting zone variance in a capillary flow injection system”, *Anal. Chem.*, 69:165-169.

Taylor, R.F., Marenchic I.G., Spencer R.H.,(1991), “Antibody and receptor-based biosensors for detection and process control”, *Analytica Chimica Acta*, 249:67-70

Tembe, S., Inamdar, S., Haram, S., Karve, M. ve D'Souza, S.F., (2007), “Electrochemical biosensor for catechol using agarose–guar gum entrapped tyrosinase”, *J of Biotech.*, 128:80-85.

Tsai, Y.C., ve Chiu, C.C., (2007), “Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafiontyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 125:10-16.

Turner, A.P.F., (2000), “Biochemistry: biosensors-senseand sensitivity”, *Science*, 290:1315-1317.

Vérdine, C., Fabiano, S. ve Tran-Minh, C., (2003), “Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support”, *Talanta*, 59:535-544.

Vianello, F., Ragusa, S., Cambria, M.T. ve Rigo, A., (2006), “A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element”, *Biosens. Bioelectron.*, 21:2155-2160.

Vincoli, J.W., (1996), *Risk Management for Hazardous Chemicals*, Lewis Publisher, New York.

Wang, B., Zhang, J., ve Dong, S., (2000), “Silica sol–gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor”, *Biosens. Bioelectron.*, 15:397-402.

Wang, J., Lu, F. ve Lopez, D., (1994), “Amperometric biosensor for phenols based on a tyrosinase–graphite–epoxy biocomposite”, *Analyst*, 119:455–458.

Yabuki, S., Mizutani, F. ve Hirata, Y., (2001), “Preparation of D-amino acid oxidase-immobilized polyion complex membranes”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 76:142-146.

Yang, S., Li, Y., Jiang, X., Chen, Z. ve Lin, X., (2006), “Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114:774-780.

Yilmaz, F., Kasapoglu, F., Hepuzer, Y., Yagci, Y., Toppare, L., Fernandes, E.G., Galli, G., (2005), “Synthesis and Mesophase Properties of Block and Random Copolymers of Electroactive and Liquid Crystalline Monomers.” *Des. Monomers Polym.*, 8: 223-236.

Yilmaz, F., Sel, O., Cirpan, A., Toppare, L., Hepuzer ve Y, Yağcı, Y., (2004), “Controlled Synthesis of Block Copolymers Containing Side Chain Thiophene Units and Their Use in Electropolymerization with Thiophene and Pyrrole.” *J. Macromol. Sci. Pure & Appl.Chem. A*, 41:403-411.

Yildiz, H.B., Castillo, J., Guschin, D.A., Toppare, L. ve Schuhmann, W., (2007), "A phenol biosensor based on the electrochemically controlled integration of tyrosinase in a redox polymer", *Microchim. Acta*, 159:27-34 .

Yu, J., Liu, S. ve Ju, H., (2003), "Mediator-free phenol sensor based on titania sol-gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method", *Biosens. Bioelectron.*, 19:509-514.

Zejli, H., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L., Naranjo-Rodriguez, I., Liu, B., Temsamani, K.R. ve Marty, J.L., (2008), "Phenol biosensor based on Sonogel-Carbon transducer with tyrosinase alumina sol-gel immobilization", *Anal. Chim. Acta*, 612:198-203.

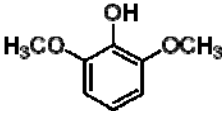
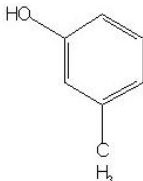
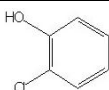
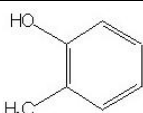
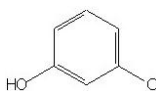
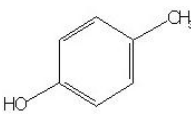
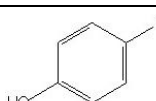
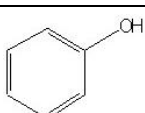
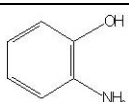
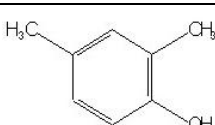
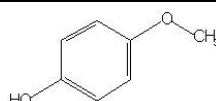
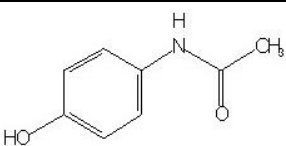
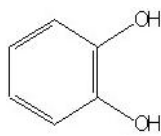
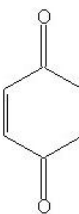
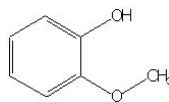
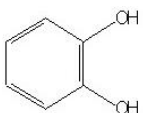
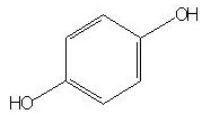
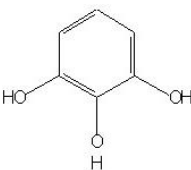
Zhao, S., Zhang, K, Bai, Y., Yang, W. ve Sun, C.,(2006), "Glucose oxidase/colloidal gold nanoparticles immobilized in nafion film on glassy carbon electrode: direct electron transfer and electrocatalysis", *Bioelectrochem.*, 69: 158-163.

Zhao, W., Song, C. ve Pehrsson, E., (2002), "Water-soluble and optically pH-sensitive single-walled carbon nanotubes from surface modification", *J. Am. Chem. Soc.*, 124:12418-12419.

Zhao, Y.L. ve Zhi J.F., (2006), "Development of an amperometric biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase on a boron-doped diamond electrode", *Electrochem. Commun.*, 8:1811-1816.

Zihnioğlu, F., Telefoncu, A., (1995), "Diffusion characteristics of chitosan-entrapped microsomal UDP-glucuronyl transferase gel beads", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*, 1244: 291-294.

EK-I

<i>Fenolik Bileşikler</i>	<i>Kimyasal Yapı</i>	<i>Fenolik Bileşik</i>	<i>Kimyasal Yapı</i>
2,6-dimetoksifenol		<i>m</i> -kresol	
2-klorofenol		<i>o</i> -kresol	
3-klorofenol		<i>p</i> -kresol	
4-klorofenol		Fenol	
2-aminofenol		2,4-dimetilfenol	
4-metoksifenol		4-asetmaidofenol	
Pyrokatekol		<i>p</i> -benzokinon	
Guaiakol (2-metoksifenol)		Katekol	
<i>Hidrokinon</i>		<i>Pyrogallol</i>	

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 24.03.1977

Doğum yeri Erzurum

Lise 1990-1993 Erzurum Lisesi

Lisans 1994-1998 Atatürk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Çevre Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans 1999-2002 Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Çevre Müh. Anabilim Dalı

Doktora 2003-2009 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Çevre Müh. Anabilim Dalı

Çalıştığı kurumlar

1999-2003 Atatürk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Çevre Mühendisliği Bölümü, Araştırma Görevlisi

2003-Devam ediyor YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi